

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Tese

Análise do óleo essencial de *Origanum majorana* relacionada ao seu potencial tóxico e antineoplásico

Cristine Cioato da Silva Guim

Pelotas, 2022

Cristine Cioato da Silva Guim

Análise do óleo essencial de *Origanum majorana* relacionada ao seu potencial tóxico e antineoplásico

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Dr^a Marlete Brum Cleff

Pelotas, 2022

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G963a Guim, Cristine Cioato da Silva

Análise do óleo essencial de *Origanum majorana* relacionada ao seu potencial tóxico e antineoplásico / Cristine Cioato da Silva Guim ; Marlete Brum Cleff, orientadora. — Pelotas, 2022.

87 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2022.

1. Manjerona. 2. Toxicidade. 3. Mecanismo de ação. 4. Câncer. 5. Efeito citostático. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Título.

CDD : 636.0896

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Cristine Cioato da Silva Guim

Análise do óleo essencial de *Origanum majorana* relacionada ao seu potencial tóxico e antineoplásico

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21/02/2020

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Carine Dahl Corcini
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Claudia Giordani
Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Rogério Antônio Freitag
Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria

Agradecimentos

Agradeço em primeiro lugar, Àquele que deu origem a tudo, que tudo vê e que certamente me acompanha sempre.

À minha família, a quem dedico mais essa conquista, agradeço pela preocupação, pelo amor, pelo carinho e, principalmente, por acreditarem tanto no meu sucesso, mesmo nos momentos em que até eu duvidava. Ao meu marido Thomas, agradeço pela presença em mais essa etapa da minha trajetória acadêmica. Mais do que isso, agradeço pela participação ativa em todas as etapas, pelo incentivo e pelo apoio, sem os quais tudo teria sido muito mais difícil. Pelo carinho e pela paciência, muito obrigada! Aos meus filhos, Matteo e Pietro, sou grata por iluminarem os meus dias e trazerem inspiração e coragem em todos os momentos.

Às amigas do coração, Claudinha, Karina, Carol, Sol e Gabi agradeço por terem alegrado tanto os meus dias. De muitas maneiras, vocês tornaram essa caminhada muito mais leve e prazerosa. Vocês são um presente que a pós-graduação me deu!

À minha orientadora Marlete, sou grata pelas lições acadêmicas e, mais do que isso, agradeço pelas lições diárias de perseverança e pelo incentivo trazido em forma de bom humor e otimismo inabaláveis. Obrigada também pela compreensão e pelos conselhos amorosos e sempre oportunos.

Aos colegas do grupo Fitopeet, que foram parte da minha família durante os anos da pós-graduação, agradeço pelo apoio e pela disposição em ajudar sempre que precisei. Às minhas queridas colegas Helena, Ceres, Débora, Rosaria e Luciana, agradeço pelo companheirismo e pela amizade.

A todas as pessoas que compõem o LABVIR, o REPROPEL, o Laboratório de Bacteriologia e o CCQFA, em especial aos professores Gefereson Fischer, Carine Dahl Corcini, Antonio Sergio Varela Junior, Rogerio Antonio Freitag e à técnica Silvia Regina Leal Ladeira agradeço por abraçarem o meu projeto junto comigo, disponibilizando um pouco de seu tempo para me auxiliar e me orientar no que fosse necessário.

À CAPES e aos demais órgãos financiadores CNPq e FAPERGS, ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, professores, alunos e servidores da Faculdade de Veterinária, obrigada.

Resumo

GUIM, Cristine Cioato da Silva. **Análise do óleo essencial de *Origanum majorana* relacionada ao seu potencial tóxico e antineoplásico**. 2021. 87f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

O câncer é apontado como um problema mundial de saúde pública, uma vez que as taxas de incidência são crescentes, a mortalidade é alta e as opções de tratamento farmacológico disponíveis apresentam efeitos adversos graves e vêm perdendo sua eficácia ao longo do tempo, devido ao desenvolvimento de mecanismos de resistência pelas células neoplásicas. Frente a essa realidade, a indústria farmacêutica tem nas plantas medicinais um amplo painel de moléculas potencialmente eficazes e menos tóxicas a serem estudadas. Atualmente já está cientificamente comprovado que os compostos químicos presentes nas plantas medicinais podem proteger as células de eventos carcinogênicos, agindo contra a promoção e a progressão tumorais. Porém, os mesmos princípios ativos que conferem as propriedades terapêuticas a essas plantas, também podem ser os responsáveis pelos seus efeitos tóxicos e reações adversas. Nesse contexto, o presente trabalho tem como objetivos estudar a citotoxicidade do óleo essencial de *Origanum majorana* (OEOM) em células espermáticas suínas e hemácias e o seu mecanismo de ação intracelular em linhagens celulares não neoplásicas (MDBK) e neoplásicas (B16F10) e determinar a sua composição química. A determinação da toxicidade do OEOM *in vitro* foi avaliada nas células espermáticas através de parâmetros de cinética (CASA) e de estrutura (citometria de fluxo), o mecanismo de ação nas células MDBK e B16F10 foi avaliado por citometria de fluxo, e a atividade hemolítica em eritrócitos caninos, pelo teste em meio líquido e em meio sólido com ágar-sangue de ovinos. Para a identificação dos compostos químicos do óleo essencial foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GC/MS-QP 2010SE-Shimadzu, Japão), equipado com auto injetor AOC-20i. As quantificações foram feitas por área normalizada e as identificações dos compostos pelo espectrômetro de massas, utilizando a biblioteca NIST 8 do GC/MS. O OEOM é composto majoritariamente por terpenos, principalmente por gama-terpineno, cis-sabineno hidratado e 4-terpineol. Na avaliação imediata da cinética espermática o OEOM reduziu a motilidade total e progressiva e a distância média percorrida em todas as concentrações testadas, enquanto que, após 24 horas, as concentrações tóxicas foram de 1 a 4 mg.mL⁻¹. Na citometria de fluxo, as estruturas afetadas foram as mitocôndrias em todas as concentrações e a membrana, que teve a sua fluidez reduzida com 0,25 e 1 mg.mL⁻¹ de OEOM. As concentrações de OEOM capazes de provocar hemólise em ambos os tipos celulares foram 1, 2 e 4 mg.mL⁻¹, chegando a percentuais de 90 a 100% de hemólise. Nos testes com a linhagem celular MDBK observou-se redução de espécies reativas

de oxigênio e lipoperoxidação em todas as concentrações utilizadas de OEOM, nas células MDBK, e também na fase S do ciclo celular. Nas células B16F10, os tratamentos com o OEOM reduziram as espécies reativas de oxigênio e as células em fase G2 e aumentaram as células na fase S. As concentrações de 0,25 e 0,5 mg.mL⁻¹ causaram redução na fluidez e aumento do potencial de membrana mitocondrial, respectivamente na linhagem MDBK, enquanto lipoperoxidação nas células B16F10 diminuíram na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹. Os resultados obtidos nesse estudo apontam para a elevada toxicidade celular demonstrada, principalmente, nas concentrações entre 1 e 4 mg.mL⁻¹ do OEOM nas células espermáticas suínas e nas hemácias. Quanto ao mecanismo de ação do OEOM, é possível supor que seu efeito seja citostático para as células neoplásicas utilizadas, devido à interferência no ciclo celular, sem exercer efeitos tóxicos na linhagem MDBK, uma vez que os parâmetros relacionados à membrana plasmática e produção e espécies reativas de oxigênio reduziram. A viabilidade celular não foi alterada em nenhuma das linhagens utilizadas nos testes. Considerando os resultados desse estudo, conclui-se que o OEOM é uma promissora fonte de moléculas com potencial terapêutico para o tratamento do câncer, uma vez que é capaz de promover a interrupção da proliferação celular da linhagem neoplásica, mesmo em concentrações baixas. A toxicidade apresentada pelo OEOM nas células sanguíneas e espermáticas foi mais evidente nas concentrações mais elevadas e não foi observada nas células MDBK.

Palavras-chave: toxicidade hemolítica; toxicidade espermática; mecanismo de ação; efeito citostático; câncer.

Abstract

GUIM, Cristine Cioato da SILVA. **Analysis of the essential oil of *Origanum majorana* related to toxic and antineoplastic potential.** 2021. 87p. Thesis (Doctorate in Sciences) -Veterinary Graduate Program, Faculty of Veterinary Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Cancer is identified as a public health problem of worldwide proportions, since incidence rates are increasing, mortality is high and the pharmacological treatment options available have serious adverse effects and have been losing their effectiveness over time due to the development of resistance mechanisms by neoplastic cells. Faced with this reality, the pharmaceutical industry has in medicinal plants a wide panel of potentially effective and less toxic molecules to be studied. It is now scientifically proven that chemical compounds present in medicinal plants can protect cells from carcinogenic events, acting against tumor promotion and progression. However, the same active ingredients that give therapeutic properties to these plants, may also be responsible for their toxic effects and adverse reactions. In this context, the present work aims to study the cytotoxicity of the essential oil of *Origanum majorana* (OEOM) in swine sperm cells and red blood cells and its mechanism of intracellular action in non-neoplastic (MDBK) and neoplastic cell lines (B16F10 - murine melanoma) and determine its chemical composition. The determination of OEOM toxicity in vitro was evaluated in sperm cells through kinetic parameters (CASA) and structure (flow cytometry), the mechanism of action in MDBK and B16F10 cells was evaluated by flow cytometry. , and hemolytic activity in canine erythrocytes, by testing in liquid and solid media with sheep blood agar. For the identification of the chemical compounds of the essential oil, a gas chromatograph coupled to a mass detector (GC / MS-QP 2010SE-Shimadzu, Japan) was used, equipped with an AOC-20i auto injector. The quantifications were made by standardized area and the identification of the compounds by the mass spectrometer, using the NIST 8 library of the GC / MS. OEOM is composed mainly of terpenes, mainly gamma-terpineno, cis-sabinene hydrate and 4-terpineol. In the immediate evaluation of sperm kinetics, OEOM reduced total and progressive motility and average distance traveled in all concentrations tested, whereas, after 24 hours, toxic concentrations were 1 to 4 mg.mL⁻¹. In flow cytometry, the affected structures were the mitochondria in all concentrations and the membrane, which had its fluidity reduced with 0.25 and 1 mg.mL⁻¹ of OEOM. The concentrations of OEOM capable of causing hemolysis in both cell types were 1, 2 and 4 mg.mL⁻¹, reaching percentages of 90 to 100% of hemolysis. In tests with the MDBK cell line, a reduction in reactive oxygen species and lipoperoxidation was observed in all concentrations of OEOM used in MDBK cells, and also in the S phase

of the cell cycle. In B16F10 cells, treatments with OEOM reduced ROS and G2 cells and increased cells in S phase. The concentrations of 0.25 and 0.5 mg.mL⁻¹ caused a reduction in fluidity and an increase in membrane potential mitochondrial, respectively in the MDBK lineage, while lipoperoxidation in B16F10 cells decreased in the concentration of 0.5 mg.mL⁻¹. The results obtained in this study point to the high cellular toxicity demonstrated, mainly, in the concentrations between 1 and 4 mg.mL⁻¹ of the OEOM in the swine sperm cells and in the erythrocytes. As for the mechanism of action of the OEOM, it is possible to assume that its effect is cytostatic for the neoplastic cells used, due to the interference in the cell cycle, without exerting toxic effects in the MDBK lineage, since the parameters related to the plasma membrane and production and reactive oxygen species reduced. Cell viability was not altered in any of the strains used in the tests. Considering the results of this study, it is concluded that OEOM is a promising source of molecules with therapeutic potential for the treatment of cancer, since it is able to promote the interruption of cell proliferation of the neoplastic lineage, even at low concentrations. The toxicity shown by OEOM in blood and sperm cells was more evident at higher concentrations and was not seen in MDBK cells.

Keywords: marjoram; mechanism of action; cytostatic effect; toxicity; cancer.

Lista de Figuras

4.1 Artigo 1	27
Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de manjerona	33
4.2 Artigo 2	38
Figura 1. Tubos contendo hemácias tratadas	43
4.3 Artigo 3	50
Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de manjerona e ilustração das fórmulas químicas de seus três componentes majoritários.....	58

Lista de Tabelas

4.1 Artigo 1	27
Tabela 1. Parâmetros celulares avaliados para estudo de mecanismo de ação de diferentes concentrações de óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> L. em linhagens celulares de melanoma (B16F10) e de não-neoplásica (MDBK) por citometria de fluxo.	34
4.2 Artigo 2	38
Tabela 1. Resultados das médias de hemólise em meio sólido (mm) e em meio líquido (%), nas diferentes concentrações de OEOM testadas.....	43
4.3 Artigo 3	50
Tabela 1. Resultados da avaliação das células espermáticas através de análise computadorizada (CASA) após contato com diferentes concentrações do óleo essencial de OEOM em zero e 24 horas de exposição.....	61
Tabela 2. Resultados obtidos a partir da avaliação espermática por citometria de fluxo com a adição diferentes concentrações de OEOM.	62

Lista de Abreviaturas e Siglas

μL	Microlitro
μM	Micromolar
a.C.	Antes de Cristo
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
ANOVA	Análise de Variância
ANR	Acrossoma Não-reagido
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AURK-A	Enzima aurora quinase
BCF	Frequência do batimento flagelar cruzado
BTS	Beltsville Thawing Solution
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CASA	Computer Assisted Sperm Analysis
CDK1	Quinase dependente de ciclina 1
CEEA	Comissão de Ética e Experimentação Animal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CO_2	Dióxido de carbono
DAP	Distância média percorrida
DFC	Carboxifluoresceína diacetato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra acético
E-MEM	Meio Essencial Mínimo de Eagle
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
F	Fluidez de membrana plasmática
FAPERGS	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FITOPEET	Grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Produtos Naturais na Clínica Médica Veterinária

g	Gramas
H2DCFDA	2´7´ - diclorohidrofluoresceína diacetato
Hz	Hertz
IFD	Índice de Fragmentação de DNA
IM	Integridade de Membrana
IP	Iodeto de propídeo
Kg	Quilograma
LabVir	Laboratório de Virologia
LPO	Lipoperoxidação
LRD	Laboratório Regional de Diagnóstico
M	Molar
MARJ	Óleo essencial de <i>Origanum majorana</i>
MDBK	Madin-Darby Bovine Kidney
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
MP	Motilidade Progressiva
MT	Motilidade Total
MTT	3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)
n°	Número
nm	Nanômetros
OEOM	Óleo essencial de <i>Origanum majorana</i>
PBS	Phosphate buffered saline
PMM	Potencial de Membrana Mitocondrial
Rh 123	Rodamina 123
seg	Segundos
SFB	Soro Fetal Bovino
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas

Sumário

1	Introdução.....	14
2	Objetivo Geral.....	16
2.1	Objetivos Específicos	16
3	Revisão da Literatura.....	17
3.1	As plantas medicinais e o câncer	17
3.2	Bioprospecção do óleo essencial de <i>Origanum majorana</i>.....	20
3.3	Testes de toxicidade com produtos naturais a base de plantas.....	22
3.3.1	Testes de toxicidade em células espermáticas	23
3.3.2	Testes de toxicidade em linhagens celulares	25
3.3.3	Testes de toxicidade em hemácias.....	26
4	Artigos.....	27
4.1	Artigo 1	27
4.2	Artigo 2.....	38
4.3	Artigo 3.....	50
5	Considerações Finais	71
	Referências.....	72
	Anexos	84

1 Introdução

O uso de plantas para prevenir e tratar doenças acontece há milhares de anos. O primeiro registro do uso de plantas com fins medicamentosos data de 2.800 a.C. (WANG et al., 2012). Nos dias atuais, já está cientificamente comprovado que os compostos químicos presentes nas plantas medicinais podem proteger as células de eventos carcinogênicos, agindo contra a promoção e a progressão tumorais (HUANG et al., 2009). Nesse contexto, a indústria farmacêutica tem impulsionado as pesquisas para a descoberta de novos fármacos, mais eficazes e menos tóxicos, a partir dos produtos naturais e de seus derivados (HUANG et al., 2009).

Dentre as plantas medicinais aromáticas amplamente utilizadas encontram-se aquelas pertencentes à família Lamiaceae, que é composta por aproximadamente 250 gêneros e 6.970 espécies, sendo primeiramente difundidas pela região do Mediterrâneo, Eurásia e no norte da África e, posteriormente introduzidas em outros países (PORTE & GODOY, 2001; GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015). No Brasil, podem ser encontrados 26 gêneros e 350 espécies dessa família (SILVA et al., 2011). Muitas espécies do gênero *Origanum sp.*, pertencente à família Lamiaceae, são conhecidas pelos seus óleos essenciais e caracterizadas pela grande diversidade morfológica e química (ALIZADEH et al., 2011; BAÂTOUR et al., 2012; GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015). As plantas desse gênero apresentam um amplo espectro de atividades biológicas, sendo utilizadas não somente em preparações medicinais, mas também em desinfetantes, cosméticos, na culinária e como conservantes de alimentos (GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015).

Estudos científicos têm demonstrado sua ação como bactericidas, antioxidantes, fungicidas, antitumorais, dentre outras, tanto na forma de óleos essenciais, como na forma de extratos (HAIDA et al., 2007; HUSSAIN et al., 2011; SILVA et al., 2011; SANTIN, et al., 2014; MATOS, 2014; WALLER et al., 2019). O *Origanum majorana* (manjerona) é uma planta aromática perene que contém grandes quantidades de compostos antioxidantes como os flavonoides e terpenoides, além dos compostos fenólicos e alcaloides (ABDEL-MASSIH et al., 2010; GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015). Essas substâncias bioativas podem prevenir doenças causadas

pelo estresse oxidativo, como por exemplo, o câncer (ABDEL-MASSIH et al., 2010; ELANSARY & MAHMOUD, 2014). Um dos mecanismos protetivos desses compostos fitoquímicos pode estar na sua capacidade de induzir sistemas celulares de defesa, como os sistemas antioxidantes e desintoxicante, além de inibir vias inflamatórias e de sinalização de crescimento celular (KWON et al., 2007). Além disso, seu potencial antioxidante pode ainda estimular mecanismos de reparo de danos no DNA celular (KWON et al., 2007; GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015). Apesar da ação quimioprotetiva dos compostos fitoquímicos já estar comprovada, ainda são necessários estudos a respeito do seu potencial tóxico, mais precisamente, das concentrações seguras e dos metabólitos que podem ser gerados no organismo a partir do seu uso (FRESCO et al., 2004; HUANG et al., 2009). Estudos realizados no Brasil demonstraram que a maioria das pessoas que utilizam plantas medicinais desconhece os seus efeitos colaterais além de utilizá-las empiricamente, sem orientações profissionais sobre dose ou frequência de administração (OLIVEIRA et al., 2014; GIORDANI et al., 2016).

Os testes *in vitro* constituem a etapa inicial para a determinação do potencial tóxico de um produto vegetal e podem reduzir o número de animais experimentais nas etapas posteriores (MONTANARI & BOLZANI, 2001; BEDNARCZUK et al., 2011). Essa etapa baseia-se no uso de organismos menores como fungos, bactérias, algas e crustáceos, além de suspensões e cultivos celulares e culturas de tecidos (BEDNARCZUK et al., 2011). Recentemente os testes envolvendo células espermáticas suínas estabeleceram-se como um importante método de triagem toxicológica, uma vez que são de fácil obtenção, não necessitando de um grande número de animais doadores e nem de métodos invasivos de coleta (VICENTE-CARRILLO et al., 2015). Além disso, apresentam sensibilidade semelhante àquela demonstrada pelas células somáticas usualmente utilizadas, sem necessitar de longos períodos de cultivo e incubação (VICENTE-CARRILLO et al., 2015). Estudos anteriores demonstraram que as células espermáticas serviram como sensores para a detecção de microrganismos ambientais e alimentares, capazes de produzir toxinas patogênicas para o homem (ANDERSSON et al., 2007; TONSHIN et al., 2010). Isso acontece, pois os espermatozoides são células sensíveis a quaisquer alterações na homeostase, como o desequilíbrio iônico, energético e, principalmente, na função mitocondrial (HOORNSTRA et al., 2003; VICENTE-CARRILLO et al., 2015).

O teste para determinar a capacidade de gerar hemólise tem sido amplamente utilizado como um indicativo de toxicidade em soluções injetáveis, além de sinalizar também a ação sobre a membrana celular. A destruição eritrocitária ocorre pela lise da bicamada lipídica, sendo essa ação dependente da concentração e da composição do extrato vegetal testado (MEHREEN et al., 2016).

Assim, diante da importância da descoberta de novas moléculas com ação antineoplásica, o entendimento dos mecanismos de ação e de toxicidade se torna essencial para a fim de determinar a aplicabilidade do óleo essencial de *O. majorana*, justificando o desenvolvimento deste projeto.

2 Objetivo Geral

O objetivo desse estudo foi avaliar a toxicidade do óleo essencial de *O. majorana* em células espermáticas, hemácias e em linhagens celulares neoplásicas e não neoplásicas, além de identificar seus componentes químicos.

2.1 Objetivos Específicos

- Obter óleo essencial de *Origanum majorana* e determinar a sua composição química;
- Testar a atividade hemolítica do óleo essencial de *O. majorana* em suspensão de hemácias caninas e ágar-sangue ovino;
- Avaliar a toxicidade do óleo essencial de *O. majorana* em células espermáticas suínas, através de análise espermática computadorizada (CASA) e citometria de fluxo;
- Identificar o mecanismo de ação do óleo essencial de *O. majorana* em nível celular, através de citometria de fluxo nas linhagens MDBK e B16F10.

3 Revisão da Literatura

3.1 As plantas medicinais e o câncer

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem há milhares de anos, sendo o primeiro registro datado de 2.800 a.C. (WANG et al., 2012). Conceitualmente, a ANVISA define uma planta medicinal como uma espécie vegetal, cultivada ou não, cujos componentes químicos apresentam alguma atividade terapêutica (BRASIL, 2011). Ainda hoje, muitos dos resultados obtidos através do uso popular das plantas são relatados informalmente e transmitidos de geração para geração, fazendo com que preparações como chás, pomadas e xaropes tenham se difundido amplamente pelo mundo, e despertassem o interesse científico, a fim de comprovar as suas propriedades medicinais (MACIEL et al., 2002; MORAES et al., 2011). Estima-se que 80% da população de países em desenvolvimento faz uso de práticas tradicionais na atenção primária de saúde e destes, 85% utilizam as plantas medicinais (CARVALHO et al., 2007 – SANTOS, 2016). Assim, frente à expansão do uso empírico de fitoterápicos observada na última década, a Organização Mundial de Saúde elaborou protocolos visando regulamentar as metodologias de avaliação para a medicina tradicional (SANTOS, 2016).

A área da farmacologia é apontada como a que mais investe em pesquisas com plantas medicinais, concentrando-se principalmente na busca por alternativas terapêuticas para o tratamento e prevenção de doenças como o câncer, doenças infecciosas, doenças degenerativas do sistema nervoso, depressão e doenças cardíacas (CARNEIRO et al., 2014). A indústria farmacêutica por sua vez, vem impulsionando a pesquisa científica, com o intuito de descobrir novas formulações para o tratamento de diversas enfermidades, para as quais os fármacos já existentes vêm perdendo eficácia, como é o caso dos antibióticos e também dos antineoplásicos, principalmente (WALLER et al., 2017; HUANG et al., 2009; KHAN et al., 2014).

A eficácia de fármacos, amplamente utilizados para o tratamento de doenças cada vez mais comuns em humanos e em animais, como o câncer, tem esbarrado nos mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células neoplásicas, como o aumento da conjugação e da excreção dos fármacos, através da ativação dos sistemas de biotransformação de xenobióticos, redução do influxo e aumento da expulsão dos fármacos em nível celular, bloqueio da apoptose e reparos no DNA celular (FUKUMASU et al., 2008). Como resultado dos investimentos da indústria farmacêutica em pesquisa, atualmente aproximadamente 35 % dos componentes das formulações terapêuticas desenvolvidas mundialmente é de origem vegetal (FERNANDES, 2016). No caso dos fármacos antineoplásicos, servem como exemplo os alcaloides da vinca, vincristina e vimblastina, derivados do *Catharanthus roseus*, utilizados amplamente para o tratamento de linfoma de Hodgkin, sarcoma de Kaposi, câncer de ovário e testículos e leucemia linfoblástica aguda infantil, o paclitaxel, isolado da casca de *Taxus baccata* e *Taxus brevifolia*, utilizado no tratamento de câncer de mama e de ovários, o etoposídeo e o teniposídeo, sintetizados a partir da podofilotoxina de plantas do gênero *Podophyllum*, empregados na terapêutica de câncer de pulmão, testículos e linfoma, entre outros (BRANDÃO et al., 2010).

A descoberta de novas alternativas terapêuticas para o tratamento do câncer é urgente, uma vez que o mesmo é considerado um problema de saúde pública de proporção mundial, sendo a segunda principal causa de morte em humanos, perdendo apenas para as enfermidades cardiovasculares (FITZMAURICE et al., 2016). Em 2013, foram registrados 14,9 milhões de casos de câncer no mundo e, em 2015, esse número subiu para 17,5 milhões, causando mais de oito milhões de mortes (NAGHAVI et al., 2015; FITZMAURICE et al., 2016).

Dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (2017) apontam os países desenvolvidos da América do Norte, Europa ocidental e também Japão, Coreia do Sul, Austrália e Nova Zelândia, são os que apresentam as maiores taxas de incidência de câncer, seguidos pelos países da América do Sul e Central, leste europeu e grande parte do sudeste asiático. Já em grande parte dos países da África do Sul e no oeste da Ásia são observadas as menores taxas de incidência de neoplasias malignas. Observa-se uma relação direta entre as condições ambientais, culturais e o nível de desenvolvimento dos países, com a localização primária das neoplasias, sendo aquelas associadas à elevada urbanização, como o câncer de pulmão, mama, próstata, cólon e reto, as mais comuns nos países desenvolvidos, enquanto que nos

países menos desenvolvidos, a maior ocorrência é de neoplasias relacionadas com infecções como o câncer de colo de útero, de estômago, esôfago e fígado. Além disso, nos países em desenvolvimento, a taxa de mortalidade em decorrência do câncer é bastante elevada, chegando a corresponder a 80% dos óbitos por câncer no mundo (INCA, 2017). No Brasil, por sua vez, estima-se o surgimento de 600 mil novos casos de câncer para os anos de 2018 e 2019, sendo prostático, pulmonar, mamário e de cólon e reto os mais incidentes, além de elevadas taxas da doença no colo do útero, estômago e esôfago (INCA, 2017). Em medicina veterinária, apesar de não haver dados de abrangência mundial publicados, sabe-se que o número de diagnósticos de neoplasias vem crescendo nos últimos anos, acompanhando o crescimento da expectativa de vida dos pacientes (WHITROW et al. 2013). O câncer é considerado atualmente a maior causa de morbidade e de mortalidade de cães e gatos idosos atualmente (WHITROW et al., 2013).

Apesar dos avanços e do surgimento de novas opções de tratamento, a quimioterapia antineoplásica ainda é rotineiramente utilizada nos pacientes com câncer, sendo empregada como terapia única ou como adjuvante e ainda, como neoadjuvante a outros tratamentos (GHULAM et al, 2008). A falta de especificidade dos fármacos antineoplásicos utilizados, que causam danos a células em rápida multiplicação, sejam elas neoplásicas ou não, causa ao paciente uma série de efeitos adversos (MELO et al., 2011). Aliados a esse fato, a resistência que alguns tumores já apresentam frente a esses fármacos e ainda o alto custo do tratamento, têm levado muitos pacientes a procurar terapias alternativas complementares aos tratamentos convencionais (GHULAM et al., 2008; MELO et al, 2011; WANG et al., 2012). Nos Estados Unidos, estima-se que cerca de 60% dos humanos diagnosticados com câncer utilizem agentes derivados de plantas ou de seus nutrientes como forma única de tratamento ou em associação à quimioterapia e à radioterapia (WANG et al; 2012).

Nos dias atuais, já está cientificamente comprovado que os compostos químicos presentes nas plantas medicinais podem proteger as células de eventos carcinogênicos, agindo contra a promoção e a progressão tumorais (HUANG et al., 2009). Já existem estudos comprovando que o óleo essencial de *Origanum vulgare* é capaz de inibir o crescimento celular e provocar a apoptose em linhagens de câncer de estômago, enquanto o óleo essencial *O. majorana* e de *Rosmarinus officinalis* exercem atividade citotóxica em linhagem celular de melanoma metastático (SILVA, 2016; BALUSAMY et al., 2018). Além disso, a manjerona ainda é capaz de inibir a

formação de metástases e a proliferação celular de câncer de mama (DHAHERI et al., 2014).

Os extratos de plantas do gênero *Origanum* são também capazes de reduzir os danos oxidativos provocados ao organismo pelos fármacos antineoplásicos, como a ciclofosfamida e a cisplatina, podendo minimizar os efeitos colaterais do tratamento quimioterápico (RAMADAN et al., 2012; HABIBI et al. 2014; SOLIMAN et al., 2016). Como antioxidante, o *O. majorana* já demonstrou em estudos *in vivo* ser capaz de reverter os danos causados pelo uso de etanol, no trato reprodutivo, fígado e cérebro (EL-ASHMAWY et al., 2007).

Um dos mecanismos antioxidantes de algumas plantas do gênero *Origanum* seria a neutralização dos radicais peróxido, que são formados a partir da etapa inicial da peroxidação lipídica, através da doação de átomos de hidrogênio provenientes dos grupamentos hidroxila presentes nas moléculas de seus componentes químicos (HABIBI et al., 2014), além da estimulação dos sistemas antioxidantes endógenos (RAMADAN et al., 2012). Os radicais livres atuam nos processos de carcinogênese e mutagênese, sendo capazes de ativar vias de sinalização, que promovem o desenvolvimento de neoplasias, através da regulação da proliferação celular, da angiogênese e da formação de metástases (BAYALA et al., 2014), sendo, portanto, um importante alvo para a prevenção do câncer. Além disso, o excesso de radicais livres no organismo causa danos à estrutura celular, como a peroxidação lipídica das membranas e a fragmentação do DNA (SOLIMAN et al., 2016).

3.2 Bioprospecção do óleo essencial de *Origanum majorana*

Origanum majorana (manjerona) é uma planta aromática perene que contém grandes quantidades de compostos antioxidantes como os flavonoides e terpenoides, além dos compostos fenólicos e alcaloides (ABDEL-MASSIH et al., 2010; GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015). Essas substâncias bioativas podem prevenir doenças causadas pelo estresse oxidativo, como por exemplo, o câncer (ABDEL-MASSIH et al., 2010; ELANSARY & MAHMOUD, 2014; SOUZA et al, 2018). Um dos mecanismos protetivos desses compostos fitoquímicos pode estar na sua capacidade de induzir sistemas celulares de defesa, como os sistemas antioxidante e desintoxicante, além de inibir vias inflamatórias e de sinalização de crescimento celular (KWON et al., 2007). Além disso, seu potencial antioxidante pode ainda estimular mecanismos de

reparo de danos no DNA celular (KWON et al., 2007; GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015).

Os óleos essenciais são uma complexa mistura de hidrocarbonetos, álcoois e compostos aromáticos, sintetizados nas células secretoras das plantas e são assim denominados pelo método de extração, que consiste na separação das substâncias voláteis através da destilação a vapor sob alta pressão (RODRIGUES, 2002; BAYALA et al., 2014). Porém, a composição química de um óleo essencial é bastante variável, de acordo com a origem e a idade da planta, as condições climáticas, a estação do ano, o método de secagem e de extração do óleo, entre outros fatores (SOLIMAN et al., 2009; SAXENA et al., 2016). Essa informação é particularmente importante, pois a composição química do óleo essencial vai influenciar nas suas propriedades terapêuticas e sensoriais, além de desempenhar um papel fundamental na capacidade de penetração e na distribuição desse produto nas células (CAL, 2006; ERDOGAN, OZCAN, 2017). Esses fatores são importantes porque vão determinar os diferentes mecanismos de ação que podem ser encontrados no óleo essencial de um mesmo tipo de planta (ERDOGAN, OZCAN, 2017). O óleo essencial de manjerona contém principalmente terpenos, flavonoides, compostos fenólicos, glicosídeos fenólicos, hidrocarbonetos e taninos (SAXENA et al., 2016; BINA et al., 2017).

A localização da planta influencia diretamente na sua composição química, sendo relatado que a manjerona originária da Turquia contém majoritariamente carvacrol e timol, enquanto a de origem europeia, marroquina e tunisiana é rica em *cis*-sabineno hidratado e 4-terpineol e contém pouca ou nenhuma quantidade de timol e carvacrol (SARER et al., 1982; RODRIGUES, 2002; NOVAK et al., 2002, BAÂTOUR et al., 2012). No sul do Brasil, por sua vez, o óleo essencial de manjerona apresenta predominantemente *cis*-sabineno hidratado e 4-terpineol (RODRIGUES, 2002). Com base em sua composição química, o *O. majorana* pode ser classificado em dois quimiotipos: quimiotipo timol ou carvacrol, conhecida como orégano branco, a manjerona constituída predominantemente por carvacrol e/ou timol; e quimiotipo 4-terpineol/sabineno hidratado, chamada de manjerona doce, aquela composta principalmente por *cis* ou *trans* sabineno hidratado e 4-terpineol (ALIZADEH et al., 2011; BAÂTOUR et al., 2012).

Os fitoquímicos *cis*-sabineno hidratado, 4-terpineol e gama-terpineno, frequentemente relatados na composição química do óleo essencial de manjerona, bem como de outras plantas da família Lamiaceae, já foram associados à sua

atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e antiproliferativa (MOSSA; NAWWAR, 2010; ALIZADEH et al., 2011; BINA et al., 2017, HAJLAOUI et al., 2016, VERMA et al., 2016). O cis-sabineno hidratado é um dos principais responsáveis pelo aroma do óleo essencial de *O. majorana* (NOVAK et al., 2002) e não há dados sobre a sua atividade isoladamente, porém, juntamente com o 4-terpineol, o *cis*-sabineno hidratado já teve seu potencial antioxidante comprovado (ALIZADEH et al., 2011; KHALED et al., 2014; ELANSARY, 2015; HAJLAOUI et al., 2016). Hajlaoui e colaboradores (2016) estudaram ainda a atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de manjerona cuja composição majoritária era 4-terpineol, *cis*-sabineno hidratado e gama-terpineno e obtiveram bons resultados frente a 25 tipos de bactérias, cinco espécies de fungos e ainda em células de carcinoma de laringe e adenocarcinoma de cólon. Em outro estudo, o 4-terpineol isoladamente foi capaz de exercer atividade anti-proliferativa, detendo o ciclo celular e ainda provocando necrose em linhagens celulares de melanoma e mesotelioma (GREAY et al., 2010). Embora existam estudos comprovando a atividade de alguns componentes majoritários das plantas medicinais isoladamente, deve-se considerar a existência de efeitos provocados pelo sinergismo entre todos os componentes do óleo essencial, majoritários e minoritários e sua influência no mecanismo de ação (HAJLAOUI et al., 2016).

3.3 Testes de toxicidade com produtos naturais a base de plantas

Estudos realizados no Brasil demonstraram que a maioria das pessoas que utilizam plantas medicinais desconhece os seus efeitos colaterais além de utilizá-las empiricamente, sem orientações profissionais sobre dose ou frequência de administração (OLIVEIRA et al., 2014; GIORDANI et al., 2016). Porém, ao contrário da crença popular, as plantas medicinais podem ser prejudiciais à saúde quando utilizadas de forma indiscriminada, pois os mesmos princípios ativos que conferem as propriedades terapêuticas de cada planta também podem ser os responsáveis pelos seus efeitos tóxicos e reações adversas. Os compostos químicos frequentemente associados às reações indesejáveis decorrentes do uso de plantas medicinais são os terpenos, glicosídeos, alcaloides, saponinas, compostos fenólicos (taninos) e os cristais (FERNANDES, 2016).

Além dos efeitos tóxicos decorrentes de fatores relacionados à própria composição química da planta, existem também aqueles efeitos provocados por substâncias contaminantes, que podem estar presentes no solo ou serem oriundas da coleta, armazenagem e processamento da planta (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Não obstante, existe ainda a preocupação com a ocorrência de interações farmacológicas em consequência do uso concomitante da fitoterapia e do tratamento convencional, podendo trazer riscos à saúde dos pacientes e até mesmo alterar a eficácia dos fármacos alopáticos (FUKUMASU et al., 2008). Porém, quando utilizados corretamente, os compostos isolados de plantas medicinais podem potencializar a ação dos fármacos, o que já foi observado em associações com antineoplásicos (GONÇALVES, 2018). Além disso, são também capazes de atenuar efeitos oxidativos em células normais, possivelmente reduzindo os efeitos colaterais da quimioterapia (MOUHID et al., 2018).

Para assegurar o uso de um produto fitoterápico, são necessários estudos científicos multidisciplinares a respeito da classificação botânica correta da planta de origem, de sua composição química, farmacologia e interações medicamentosas e indicações de uso (SIMÕES; SCHENKEL, 2002; FERNANDES, 2016). Sendo assim, os testes *in vitro* constituem a etapa inicial para a determinação do potencial tóxico de um extrato vegetal e podem reduzir o número de animais experimentais nas etapas posteriores (MONTANARI & BOLZANI, 2001; BEDNARCZUK et al., 2011). Essa etapa baseia-se no uso de organismos menores como fungos, bactérias, algas e crustáceos, além de suspensões e cultivos celulares e culturas de tecidos (BEDNARCZUK et al., 2011).

Apesar de necessárias, de maneira geral, ainda são escassas as pesquisas que avaliam o uso seguro e correto de plantas medicinais e de fitoterápicos no Brasil, assim como também é precária a fiscalização da sua comercialização em feiras livres, mercados ou lojas de produtos naturais (MACIEL et al., 2002; FUKUMASU et al., 2008).

3.3.1 Testes de toxicidade em células espermáticas

Os espermatozoides de diferentes classes de animais, como peixes e mamíferos, vem sendo utilizados nas pesquisas científicas com o objetivo de avaliar os efeitos de substâncias potencialmente tóxicas presentes no ambiente e/ou ligadas

a atividades laborais, como os agrotóxicos atrazina, clorotalonil e glifosato, metais como cobre e cádmio e o bisfenol A, presente em alguns materiais plásticos (KALB et al., 2015; ACOSTA et al., 2016; SILVEIRA et al., 2018; LOPES et al., 2020; SAAFELD et al., 2019).

Os espermatozoides mostram-se como bons marcadores toxicológicos, pois são bastante sensíveis a alterações homeostáticas, principalmente quando afetam a função mitocondrial e, conseqüentemente a sua produção energética, comprometendo a motilidade e outros parâmetros relacionados com a sua cinética, que são fundamentais para o desempenho de suas funções (HOORNSTRA et al., 2003; VICENTE-CARRILLO et al., 2015). Além disso, são células de fácil obtenção, uma vez que não necessitam de métodos invasivos de coleta, na maioria das vezes, e nem de um grande número de animais doadores (VICENTE-CARRILLO et al., 2015).

O sistema computadorizado de análise de espermatozoides (Computer Assisted Sperm Analysis - CASA) é uma metodologia que permite a avaliação objetiva da motilidade espermática. Consiste em um sistema automático que possibilita a visualização, digitalização e análise de imagens sucessivas das células espermáticas, e assim, fornece informações precisas de sua cinética, como motilidade progressiva e total, velocidade e distância percorrida, sendo capaz de detectar mudanças sutis nesses parâmetros, sob condições experimentais (MATOS et al., 2008).

O uso de marcadores fluorescentes e da citometria de fluxo, fornece informações complementares àquelas obtidas com o CASA. Através dessa técnica de análise, os corantes fluorescentes são utilizados para marcar as estruturas celulares, danificadas ou não, e, pela leitura no citômetro de fluxo, permitem a identificação de alterações estruturais ou metabólicas (BERGSTEIN et al., 2014).

Inicialmente, essas técnicas foram desenvolvidas com o objetivo de avaliar a qualidade do sêmen e evitar, assim, o insucesso dos programas de fertilização e as conseqüentes perdas reprodutivas e financeiras. Porém, a aplicabilidade de técnicas mais avançadas acabou restringindo-se aos centros de pesquisa, onde são geradas informações importantes a respeito das características funcionais e estruturais das células espermáticas, de maneira criteriosa e rápida, sendo, portanto, bastante úteis em estudos de triagem toxicológica (BERGSTEIN et al., 2014).

3.3.2 Testes de toxicidade em linhagens celulares

Estudos de toxicidade com plantas medicinais também são pouco realizados, principalmente aqueles que avaliam sua ação em nível celular. Essas avaliações são necessárias para aumentar a segurança da população que faz uso dessas plantas (FERNANDES, 2016). Os testes que utilizam linhagens celulares são amplamente aplicados em pesquisas básicas preliminares, pois permitem a observação das alterações celulares provocadas pela substância a ser testada do ponto de vista microscópico, químico e molecular (MORALES, 2008) e tem como vantagens a reprodutibilidade, a sensibilidade e a rapidez de obtenção de resultados (BEDNARCZUK et al., 2010). Avaliações citotóxicas feitas a partir de cultivos celulares foram desenvolvidas como um método de triagem que antecede os testes *in vivo*, reduzindo o número de animais necessários para essa etapa (BONES & MOLETO, 2011).

O efeito das substâncias aplicadas nas células em cultivo pode ser avaliado de várias formas, através de técnicas colorimétricas simples como a do MTT (3-(4,5-dimethylthiazolone-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide), onde o parâmetro celular avaliado é a viabilidade mitocondrial (MOSMANN, 1983), ou utilizando técnicas mais modernas e completas, como a citometria de fluxo, onde podem ser avaliadas diversas estruturas celulares, de maneira individualizada, através do uso de fotomarcadores específicos que reagem ao passarem por um feixe de luz (BERGSTEIN et al., 2014). A escolha do método de avaliação depende dos objetivos da pesquisa, da disponibilidade de equipamentos e de pessoal treinado para utilizá-lo e para realizar a leitura dos resultados.

Apesar de promoverem a redução do número de modelos animais necessários para a pesquisa, os testes com células *in vitro*, porém, não podem substituir completamente os testes *in vivo*. Isso porque não é possível reproduzir em uma linhagem celular, todas as estruturas teciduais e os processos de transporte e biotransformação que ocorreriam no organismo em resposta a uma substância-teste, podendo haver, dessa forma, uma superestimação da sua toxicidade (MORALES, 2008).

3.3.3 Testes de toxicidade em hemácias

São vários os mecanismos que culminam na lise das hemácias, dependendo da substância presente no fitoterápico, resultantes do seu próprio metabolismo, de contaminantes ou de agentes emulsificantes (FERNANDES, 2016). Entre esses mecanismos, podemos citar a solubilização da membrana eritrocitária e a lise osmótica, por alteração na permeabilidade de membrana, que ocorrem na presença de substâncias surfactantes, ou então por oxidação da hemoglobina em metemoglobina, pelos compostos fenólicos e ainda pela peroxidação dos lipídeos de membrana, pelos metais pesados (BUKOWSKA; KOWALSKA, 2004; APARICIO et al., 2005; PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

A capacidade de um produto vegetal de causar hemólise depende da composição química da planta e de sua concentração no fitoterápico, e é um parâmetro toxicológico cuja avaliação é fundamental, principalmente naqueles com pretensão de uso injetável (BEDNARCZUK et al., 2008). Produtos de uso tópico a base de plantas também necessitam dos testes de toxicidade hemolítica, uma vez que os mesmos compostos que facilitam a penetração dos princípios ativos nas células, através do aumento da fluidez provocado pela ruptura das pontes de hidrogênio existentes entre os lipídios de membrana, também podem agir nos eritrócitos, provocando a sua ruptura, como é o caso dos terpenos, presentes principalmente nos óleos essenciais (ZHAO, SINGH, 2000).

Os testes de hemólise são empregados em estudos com plantas de interesse na pecuária, sendo positivos principalmente nas plantas que contêm saponinas em sua composição (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006). Também são realizados testes que avaliam a toxicidade em hemácias com produtos de origem vegetal destinados ao uso como biopesticidas (MANCINI et al., 2014).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Potencial antiproliferativo do óleo essencial de *Origanum majorana* Linn. em células de melanoma e seus efeitos intracelulares em células neoplásicas e não-neoplásicas

Cristine Cioato da Silva; Claudia Giordani; Stefanie Bressan Waller; Karina Affeldt Guterres; Soliane Carra Perera; Gabriela de Almeida Capela; Rogerio Antonio Freitag; Antonio Sergio Varela Junior; Tony Picoli; Geferson Fischer; Carine Dahl Corcini; Marlete Brum Cleff

Aceito para publicação na revista Research, Society and Development

Potencial antiproliferativo do óleo essencial de *Origanum majorana* Linn. em células de melanoma e seus efeitos intracelulares em células neoplásicas e não-neoplásicas

Antiproliferative potential of the essential oil of *Origanum majorana* Linn. in melanoma cells and intracellular effects on neoplastic and non-neoplastic cells

Potencial antiproliferativo del aceite esencial de *Origanum majorana* Linn. en células de melanoma y sus efectos intracelulares en células neoplásicas y no neoplásicas

RESUMO

Os objetivos desse estudo foram avaliar a atividade intracelular do óleo essencial de *Origanum majorana* (MARJ) nas linhagens Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) e de melanoma metastático murino (B16F10) e elucidar a sua composição química. Através da citometria de fluxo foram analisados os parâmetros fluidez de membrana (F), espécies reativas de oxigênio (ERO), índice de fragmentação de DNA (IFD), potencial de membrana mitocondrial (PMM), ciclo celular, lipoperoxidação da membrana plasmática (LPO), viabilidade celular, necrose e apoptose das linhagens celulares tratadas com MARJ nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg.mL⁻¹ por 24 horas. A composição do MARJ foi determinada através de cromatografia gasosa, sendo seus componentes majoritários os terpenos: *cis*-sabineno hidratado, 4-terpineol e gama-terpineno. Os resultados mostraram que todas as concentrações de MARJ reduziram ERO, LPO e as células em fase S da linhagem MDBK. Nas células B16F10, os tratamentos com MARJ reduziram ERO e as células em fase G2, aumentando as células na fase S. As concentrações de 0,5 e 1 mg.mL⁻¹ causaram redução na F e 0,5 mg.mL⁻¹ aumentou o PMM na linhagem MDBK, enquanto LPO foi reduzida na concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ nas células B16F10. Os resultados das avaliações da produção de ERO, da integridade da membrana plasmática e de LPO indicaram atividade antioxidante nas linhagens estudadas. Através da análise do ciclo celular foi possível observar que MARJ exerceu efeito antiproliferativo sobre as células de melanoma, sendo capaz de interromper a multiplicação desse tipo celular.

Palavras-chave: citometria de fluxo; câncer; citotoxicidade, melanoma, manjerona.

ABSTRACT

The objectives of this study were to evaluate the intracellular activity of the essential oil of *Origanum majorana* (MARJ) in Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) and murine metastatic melanoma (B16F10) and elucidate your chemical composition. Through flow cytometry parameters were analyzed membrane fluidity (F), reactive oxygen species (ROS), DNA fragmentation index (IFD), mitochondrial membrane potential (MMP), cell cycle, plasma membrane lipoperoxidation (LPO), cell viability, necrosis and apoptosis of cell lines treated with MARJ at concentrations of 0.25, 0.5 and 1 mg.mL⁻¹ for 24 hours. The composition of MARJ was determined by gas chromatography, and its major components were terpenes: hydrated *cis*-sabinene, 4-terpineol and gamma-terpinene. The results showed that all MARJ concentrations reduced ROS, LPO and S phase cells of the MDBK lineage. In B16F10 cells, MARJ treatments reduced ROS and cells in G2 phase, increasing cells in S phase. Concentrations of 0.5 and 1 mg.mL⁻¹ caused a reduction in F and 0.5 mg.mL⁻¹ increased the MMP in the MDBK lineage, while LPO was reduced at the concentration of 0.5 mg.mL⁻¹ in the B16F10 cells. The results of the

evaluations of ROS production, plasma membrane integrity and LPO indicated antioxidant activity in the cells studied. Through cell cycle analysis, it was possible to observe that MARJ exerted an antiproliferative effect on melanoma cells, being able to interrupt the multiplication of this cell type.

Keywords: flow cytometry; cancer; cytotoxicity, melanoma, marjoram.

RESUMÉN

Los objetivos de este estudio fueron evaluar la actividad intracelular del aceite esencial de *Origanum majorana* (MARJ) en linajes de Madin Darby Bovine Kidney (MDBK) y melanoma metastásico murino (B16F10) y dilucidar su composición química. Mediante citometría de flujo se analizaron parámetros de fluidez de membrana (F), especies reactivas de oxígeno (ERO), índice de fragmentación del ADN (IFA), potencial de membrana mitocondrial (PMM), ciclo celular, lipoperoxidación de la membrana plasmática (LPO), viabilidad celular, necrosis y apoptosis de linajes celulares tratadas con MARJ a concentraciones de 0,25, 0,5 y 1 mg.mL⁻¹ durante 24 horas. La composición de MARJ se determinó por cromatografía de gases, y sus componentes principales fueron terpenos: cis-sabineno hidratado, 4-terpineol y gamma-terpineno. Los resultados mostraron que todas las concentraciones de MARJ redujeron ERO, LPO y células de fase S del linaje MDBK. En las células B16F10, los tratamientos MARJ redujeron ERO y células en fase G2, aumentando las células en fase S. Concentraciones de 0.5 y 1 mg.mL⁻¹ provocaron una reducción en F y 0.5 mg.mL⁻¹ aumentaron las PMM en el linaje MDBK, mientras que la LPO se redujo a la concentración de 0,5 mg.mL⁻¹ en las células B16F10. Los resultados de las evaluaciones de producción de ERO, integridad de la membrana plasmática y LPO indicaron actividad antioxidante en las células estudiadas. A través del análisis del ciclo celular, se pudo observar que MARJ ejercía un efecto antiproliferativo sobre las células del melanoma, pudiendo interrumpir la multiplicación de este tipo celular.

Palabras llave: citometría de flujo; cáncer; citotoxicidad, melanoma, mejorana.

1. Introdução

O câncer é considerado um problema de saúde pública global, sendo a segunda principal causa de morte em humanos, perdendo apenas para as enfermidades cardiovasculares (Fitzmaurice et al., 2016). No ano de 2020, o Brasil registrou mais de 626 mil novos casos de câncer em humanos (INCA, 2021). Em nível mundial, o câncer de pele é o mais diagnosticado, sendo o carcinoma basocelular o tipo mais frequente (Bray et al., 2018). O melanoma, apesar não ser a mais incidente, é a neoplasia com maiores taxas de formação de metástase e de mortalidade (American Cancer Society, 2021). Melanomas são neoplasmas malignos formados a partir de melanócitos e melanoblastos, que são células produtoras de melanina (Goldschmidt & Hendrick, 2002). Em animais domésticos, os cães são a espécie mais comumente afetada, ao contrário dos gatos, que raramente apresentam esse tipo de neoplasia (Weyden et al., 2020). Em cães, os melanomas cutâneos são os mais frequentes, assim como em humanos, mas essa neoplasia pode ocorrer primariamente também em mucosas, leito subungueal, globo ocular, trato gastrointestinal e sistema nervoso central (Silva et al., 2017; Weyden et al., 2020).

Por tratar-se de uma doença de prognóstico desfavorável e com resposta terapêutica limitada, principalmente em medicina veterinária, o câncer vem despertando o interesse científico para a busca de novas formulações medicamentosas que sejam atuantes em alvos tumorais específicos, reduzindo os efeitos colaterais e adversos da

terapia, além de superar os mecanismos de resistência desenvolvidos pelas células neoplásicas, ou ainda, que apresentem propriedades preventivas à formação de neoplasias (Khan et al, 2014; Fitzmaurice et al., 2016). Como estratégia de busca de novas fontes terapêuticas, estudos com plantas medicinais têm destacado o potencial antineoplásico de *Origanum majorana* Linn. (Lamiaceae), popularmente conhecida por manjerona. Extratos dessa planta já demonstraram capacidade em impedir a progressão tumoral, inibindo a formação de metástases e a proliferação celular maligna em células neoplásicas cerebrais (Dhaheri et al., 2014), estomacais (Balusamy et al., 2018) e de melanoma (Silva, 2016), além de apresentar baixa toxicidade para células não neoplásicas (Dhaheri et al., 2013; Silva, 2016; Balusamy et al., 2018). Além disso, essa planta apresenta ainda potencial para prevenção do câncer, graças às propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (El-Ashmawy et al., 2007; Ramadan et al., 2012; Habibi et al., 2014).

O mecanismo de ação dessa planta pode variar em função do método de extração de seus componentes e pode envolver a expressão ou supressão gênica, as vias de sinalização do ciclo celular, apoptose e diferenciação celular (Tatman & Mo, 2002). Porém, apesar de ter seus efeitos antitumorais reconhecidos, ainda há poucos estudos que elucidem o mecanismo de ação do *Origanum majorana* em células de melanoma.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivos a avaliação dos efeitos intracelulares do óleo essencial de *Origanum majorana* Linn. em uma linhagem celular neoplásica de melanoma metastático murino (B16F10) e em uma não-neoplásica, de rim bovino (MDBK) e determinar a sua composição química.

2. Materiais e métodos

2.1. Obtenção do material vegetal e extração do óleo essencial

As folhas secas de *O. majorana* Linn. foram adquiridas de distribuidor comercial. Para a extração do óleo essencial, foi realizada a extração com arraste de vapor, em aparelho Clevenger, durante 4 horas (Brasil, 1988). Após a extração, o óleo essencial foi submetido à secagem com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4 , p.a.), concentrado em nitrogênio (N_2 , 99.99% w/v, White Martins) e armazenado em frasco âmbar, sob refrigeração.

2.2. Determinação da composição química do óleo essencial de *O. majorana*

Para a identificação dos compostos químicos do óleo essencial foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GC/MS-QP 2010SE-Shimadzu, Japão), equipado com auto injetor AOC-20i. As quantificações foram feitas por área normalizada e as identificações dos compostos pelo espectrômetro de massas, utilizando a biblioteca NIST 8 do GC/MS.

2.3. Preparo e tratamentos dos cultivos celulares

Os efeitos intracelulares foram avaliados em linhagens celulares de rim bovino (Madin Darby Bovine Kidney – MDBK) e de melanoma murino (linhagem B16F10) crescidas em meio essencial mínimo de Eagle (E-MEM, Sigma-Aldrich®), conforme metodologia prévia (Waller et al., 2019). O meio E-MEM foi suplementado com soro fetal bovino a 10% (SFB), penicilina (Sigma-Aldrich®), estreptomicina (Vetec®), enrofloxacina (Bayer®) e anfotericina B (Cristália®), com pH 7,2 e mantido em estufa com atmosfera úmida com CO_2 a 5%, a 37°C de temperatura.

As células em fase exponencial de crescimento foram então diluídas em E-MEM, suplementado com 10% de SFB até alcançar a concentração de 3×10^4 células.mL⁻¹. Alíquotas da suspensão (100 µL) foram transferidas para poços individuais de microplacas, e incubadas em estufa com meio E-MEM com 5% de CO₂ a 37°C. Após 24 horas de incubação, as células foram tratadas com o óleo essencial de *O. majorana* (MARJ) nas concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg.mL⁻¹, em triplicata, por 24 horas, e incubadas em atmosfera úmida com 5% CO₂ por 24 horas a 37°C (exceto as células utilizadas para determinação de LPO, que, de acordo com a metodologia específica, receberam os tratamentos, conforme descrito no item 2.4.5). Transcorridas 24 horas de incubação, as suspensões de células referentes a cada tratamento foram transferidas para um tubo cônico (Eppendorf®) e procedeu-se de acordo com a metodologia indicada para cada leitura realizada na citometria de fluxo.

2.4. Citometria de fluxo das linhagens celulares B16F10 e MDBK

Potencial de membrana mitocondrial (PMM), apoptose, necrose, espécies reativas de oxigênio (ERO), ciclo celular, índice de fragmentação de DNA (IFD), fluidez de membrana (F) e lipoperoxidação (LPO) foram os parâmetros avaliados através de citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing - Life Technologies), utilizando o programa Attune Cytometric Software v 2.1.

Para a análise, as populações celulares foram avaliadas pelo fotodetector VL1 (filtro 450/40), e as células receberam Hoechst 33342 para todas as análises. As fluorescências de H₂DCFDA (para avaliação das ERO) e rodamina 123 (funcionalidade de mitocôndrias - PMM) foram lidas através do fotodetector BL1 (filtro 530/30). A fluorescência de iodeto de propídeo (para as avaliações de necrose, fragmentação de DNA e ciclo celular) foi lida através do fotodetector BL3 (filtro 640LP). Dez mil eventos foram analisados por amostra com fluxo de 50 células.seg⁻¹. Debris celulares e células agrupadas foram eliminados baseando-se em gráficos de dispersão (Petrunkina et al., 2013).

2.4.1. Potencial de membrana mitocondrial (PMM)

O potencial de membrana mitocondrial foi avaliado usando rodamina 123. Após serem incubadas com as três concentrações do óleo essencial, as células foram lavadas duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) e incubadas com E-MEM e 150 µL de rodamine 123 durante 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 300 µL de Hoechst 33342 por 30 minutos e realizada a leitura. A intensidade da rodamina 123 está diretamente relacionada ao potencial da membrana mitocondrial, pois ela se concentra nas mitocôndrias mais ativas (Sharma et al., 2010).

2.4.2. Necrose e apoptose

Após 24 horas de incubação com as três concentrações de MARJ, as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram acrescidos 0,2 µL de Annexin V conjugado com isotiocianato de fluoresceína (FITC), sendo as placas incubadas por 60 minutos a 37°C. Em seguida, foram acrescentados 80 µL de E-MEM e 2 µL de iodeto de propídeo (IP), sendo novamente incubadas por 30 minutos. Posteriormente, foi removido o sobrenadante e as placas foram novamente incubadas por 5 minutos com paraformaldeído e em seguida acondicionadas em gelo até a leitura (Abdel-Massih et al., 2010). As células normais e viáveis não apresentam marcação (FITC -, IP -); as células apoptóticas externalizam a fosfatidilserina que é reconhecida pelo Annexin V (FITC +, IP-); células necróticas são reconhecidas por ter a membrana nuclear rompida e IP ligado ao material genético (FITC-, IP+ e FITC+, IP+).

2.4.3. Espécies reativas de oxigênio (ERO)

Após a incubação das células com o MARJ por 22 horas, foram acrescentados 2 μL de $\text{H}_2\text{DCF-DA}$ e novamente incubados por 90 minutos. Posteriormente, foram adicionados 4 μL de iodeto de propídeo, incubados por 20 minutos e então acrescentados 2 μL de H33342. Após 10 minutos foi então realizada a leitura (Domínguez-Rebolledo et al., 2010). Os resultados obtidos nesta avaliação são expressos em intensidade de luminosidade.

2.4.4. Ciclo celular

Após os tratamentos, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em 1 mL de solução hipotônica gelada contendo 0,1% de triton X-100, 0,1% de tampão de citrato e 0,1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de RNase e 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de iodeto de propídeo e incubadas durante 15 minutos a 37°C, protegidas da luz. Após a incubação, a suspensão celular foi analisada quanto às proporções relativas de células na fase G0-G1, fase S e fase G2/M (Arathi et al., 2016).

2.4.5. Lipoperoxidação (LPO)

As células foram incubadas por 4 horas com 1 μL de C11-BODIPY, antes da adição do óleo essencial. Após esse período, foram acrescentadas as três concentrações de óleo essencial de manjerona e as células foram incubadas por 24 horas antes da leitura sendo os resultados expressos através da média das fluorescências verde (presença de lipoperoxidação) e vermelha (ausência de lipoperoxidação), considerada a porcentagem de presença de LPO (Silva et al., 2012).

2.4.6. Índice de fragmentação do DNA (IFD)

Para a avaliação do DNA, após a incubação das células com os tratamentos por 24 horas, foram adicionados 150 μL de tampão TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 7,2) por 30 segundos, posteriormente 300 μL de Triton (0,1% Triton X-100) por 30 segundos, e 150 μL de acridine laranja (ácido cítrico 0,037 M, Na_2HPO_4 0,126 M, 0,0011 M de EDTA dissódico, NaCl 0,15 M, pH 6,0) por 2 minutos (Evenson & Jost, 1994). As leituras foram realizadas em até 2 minutos após a adição do corante, e os resultados expressos em índice de DNA fragmentado.

2.5. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas pelo software Statistix versão 10.0®, utilizando a análise de variância (ANOVA) para comparação entre os tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, sendo considerados resultados significativos quando $p < 0,05$.

3. Resultados e discussão

O óleo essencial utilizado nesse estudo apresentou os terpenos como constituintes majoritários, sendo o *cis*-sabineno hidratado, o 4-terpineol e o gama-terpineno, os predominantes (Figura 1). Esses compostos são reconhecidos por suas propriedades antioxidantes (Del Ré & Jorge, 2012). Além disso, deve-se considerar ainda o sinergismo existente entre os componentes de um óleo essencial, o que pode potencializar as suas propriedades terapêuticas (Hajlaoui et al., 2016; Nanni et al., 2020).

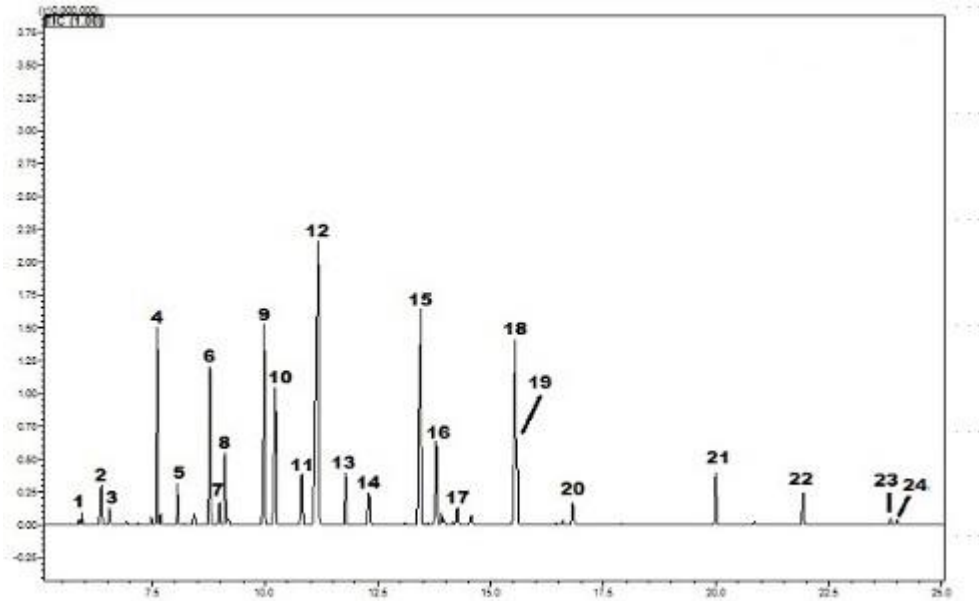


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de manjerona

Fonte: DA SILVA, Cristine Cioato

Os picos enumerados correspondem aos compostos químicos (tempo de retenção; área): 1 – não identificado (5,92 min.; 0,35%); 2 - α -thujene (6,36 min.; 1,6%), 3 - α -pinene (6,53 min.; 0,61%), 4 - α -phelandrene (7,59 min.; 7,52%), 5 - β -pinene (8,06 min.; 1,43%), 6 - α -terpinene (8,77 min.; 6,13%), 7 - ρ -cymene (pico 7), 8 - β -phelandrene (9,10 min.; 2,97%), 9 - γ -terpinene (9,98 min.; 8,90%), 10 - trans-sabinenehydrate (10,22min.;6,40%), 11 - δ -2-carene (10,81 min.; 2,01%), 12 - cis-sabinene hydrate (11,16 min.; 22,20%), 13 - não identificado (11,77 min.; 2,09%), 14 - não identificado (12,29 min.; 1,33%), 15 - terpinen-4-ol (13,44 min.; 14,10%), 16 - α -terpineol (13,79 min.; 3,86%), 17 - não identificado (14,25 min.; 0,67%), 18 - não identificado (15,54 min.; 9,90%), 19 - linalool acetate (15,57 min.; 1,92%), 20 - 4-terpinenyl acetate (16,81 min.; 0,93%), 21 - caryophyllene (19,99 min.; 2,43%), 22 - elixene (21,92 min.; 1,47%), 23 - spathulenol (23,86 min.; 0,30%), 24 - não identificado (24,0 min.; 0,17%). Destacam-se os picos 12, 15 e 9 que correspondem aos compostos majoritários identificados.

Conforme os resultados expressos na Tabela 1, o óleo essencial de MARJ manteve a viabilidade celular em ambas as linhagens, neoplásica (B16F10) e não-neoplásica (MDBK). Não houve alteração de fluidez (F) em células de melanoma, enquanto MARJ a 0,5 e 1 mg.mL⁻¹ reduziu F nas células não-neoplásicas. Embora alguns componentes terpênicos de MARJ sejam capazes de aumentar a F por interagirem com pontes de hidrogênio na bicamada lipídica, com risco de morte celular (Mendanha et al., 2013), inclusive sobre membrana plasmática de células de hepatoma (Erdogan & Ozcan, 2017), não foi observada alteração na membrana plasmática das células de melanoma no presente estudo. Também não foram observados prejuízos à viabilidade celular em decorrência da redução da fluidez nas membranas celulares na linhagem MDBK (com MARJ a 0,5 e 1 mg.mL⁻¹).

Tabela 1. Parâmetros celulares avaliados para estudo de mecanismo de ação de diferentes concentrações de óleo essencial de *Origanum majorana* L. em linhagens celulares de melanoma (B16F10) e de não-neoplásica (MDBK) por citometria de fluxo.

Parâmetros	Linhagem celular	<i>Origanum majorana</i> L. (mg.mL ⁻¹)			
		0	0,25	0,5	1
F (%)	MDBK	31,25 ^A ± 7,14	36,62 ^A ± 24,11	10,95 ^B ± 2,82	12,12 ^B ± 1,94
	B16F10	21,70 ^A ± 22,14	35,45 ^A ± 34,48	31,77 ^A ± 24,46	29,65 ^A ± 19,63
ERO	MDBK	8637,8 ^A ± 5683,4	1521,5 ^B ± 548,47	751,2 ^B ± 659,41	315,5 ^B ± 96,97
	B16F10	10546 ^A ± 6072,1	3138,5 ^B ± 258,9	2616,5 ^B ± 544,03	2413,3 ^B ± 850,25
LPO (%)	MDBK	53,13 ^A ± 3,52	34,94 ^B ± 3,56	20,87 ^C ± 2,16	36,16 ^B ± 1,68
	B16F10	50,18 ^A ± 8,08	36,91 ^{AB} ± 12,07	28,93 ^B ± 2,75	42,25 ^{AB} ± 23,28
IFD	MDBK	0,28 ^A ± 0,21	0,20 ^A ± 0,25	0,41 ^A ± 0,24	0,43 ^A ± 0,21
	B16F10	0,23 ^A ± 0,03	0,22 ^A ± 25,21	0,23 ^A ± 9,82	0,20 ^A ± 0,05
Apoptose	MDBK	0,12 ^A ± 0,19	0,07 ^A ± 0,15	0,17 ^A ± 0,22	0,22 ^A ± 0,26
	B16F10	4,07 ^A ± 4,87	4,32 ^A ± 7,52	6,10 ^A ± 7,95	14,02 ^A ± 16,4
Necrose (%)	MDBK	14,15 ^{AB} ± 11,30	18,05 ^A ± 10,05	8,1 ^{AB} ± 4,76	4,7 ^B ± 1,65
	B16F10	29,30 ^A ± 27,87	35,65 ^A ± 25,37	40,45 ^A ± 23,77	24,30 ^A ± 27,87
Viabilidade (%)	MDBK	85,72 ^{AB} ± 11,16	81,87 ^B ± 9,96	91,72 ^{AB} ± 4,56	95,07 ^A ± 1,42
	B16F10	66,62 ^A ± 26,31	60,02 ^A ± 25,21	53,45 ^A ± 19,79	61,67 ^A ± 24,92
PMM (%)	MDBK	23,2 ^B ± 4,18	40,15 ^A ± 4,18	23,54 ^B ± 2,89	23,2 ^B ± 3,74
	B16F10	75,67 ^{AB} ± 50,05	67,08 ^B ± 56,68	62,38 ^B ± 71,47	142,40 ^A ± 54,64
Ciclo Celular					
G1 (%)	MDBK	32,15 ^{AB} ± 14,77	25,56 ^B ± 5,4	29,42 ^{AB} ± 13,7	43,43 ^A ± 18,66
	B16F10	9,5 ^A ± 1,35	4,33 ^B ± 0,28	5,95 ^{AB} ± 1,37	5,35 ^{AB} ± 1,11
S (%)	MDBK	43,33 ^A ± 15,2	14,81 ^B ± 3,6	20,40 ^B ± 4,51	22,12 ^B ± 7,6
	B16F10	28,38 ^B ± 2,33	84,78 ^A ± 2,9	90,95 ^A ± 2,21	89,23 ^A ± 0,91
G2 (%)	MDBK	24,51 ^C ± 1,9	59,63 ^A ± 5,11	50,18 ^{AB} ± 17,62	34,45 ^{BC} ± 24,8
	B16F10	62,13 ^A ± 3,42	10,9 ^B ± 2,86	3,1 ^B ± 0,92	5,43 ^B ± 1,72

Fonte: DA SILVA, Cristine Cioato

^{ABC}Letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre as concentrações na avaliação de um mesmo parâmetro (p<0,05). MEM: Meio Essencial Mínimo; F: Fluidez; ERO: Espécies Reativas de Oxigênio; PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial; IFD: Índice de fragmentação de DNA; LPO: Lipoperoxidação.

A produção de ERO foi indiretamente proporcional às concentrações de MARJ, que a 1 mg.mL⁻¹ levou à menor porcentagem de ERO em ambas as linhagens celulares, especialmente em MDBK. De forma semelhante, a lipoperoxidação (LPO) também diminuiu nas células neoplásicas e não-neoplásicas. Quando estão em equilíbrio, as ERO são fisiologicamente formadas em pequenas quantidades a partir do metabolismo aeróbio de forma constante, sendo neutralizadas por antioxidantes enzimáticos endógenos (Ramadan et al., 2012; Soliman et al., 2016) Porém, o excesso de produção de ERO danifica as estruturas celulares, devido à oxidação que provoca nos

lipídios da membrana plasmática, na molécula de DNA e em proteínas celulares (Soliman et al., 2016), estando envolvido na carcinogênese e na mutagênese (Abdel-Massih et al., 2010; Bayala et al., 2014).

Outra estrutura que é afetada quando há excesso de ERO é a membrana mitocondrial, que pode ter perda do seu potencial, causando danos à cadeia respiratória celular, sendo essa também uma via de indução ao processo apoptótico (Nanni et al., 2020). Tais alterações não foram observadas nos tratamentos com MARJ, havendo aumento do PMM na linhagem MDBK somente com a concentração de 0,25 mg.mL⁻¹, sem provocar alterações mitocondriais nas células cancerígenas. A atividade antioxidante do MARJ percebida nas estruturas celulares como mitocôndrias (PMM), membrana plasmática (F e LPO) e no DNA (IFD) de ambas as linhagens estudadas, é corroborada pelos resultados obtidos no parâmetro apoptose, que não foi alterado em nenhuma das concentrações utilizadas de MARJ. Esses resultados indicam que MARJ é incapaz de induzir a morte celular através do aumento do estresse oxidativo e de suas consequentes lesões estruturais, o que é promissor, principalmente em relação às células saudáveis.

O efeito citoprotetor de MARJ foi demonstrado em rins afetados por danos tóxicos de cisplatina (Soliman et al., 2016) e na pele, fígado e baço de ratos experimentalmente infectados com patógeno fúngico (Waller et al., 2019), sem causar prejuízo na terapia principal. Esses resultados estão de acordo com o presente estudo e mostram a possibilidade do uso de MARJ na proteção de diferentes tecidos orgânicos, de forma adjuvante ao tratamento convencional, visando reduzir os efeitos adversos.

A principal diferença de atividade de MARJ entre as linhagens utilizadas observada nesse estudo, está no ciclo celular. Enquanto nas células MDBK houve um aumento na porcentagem de células tratadas com MARJ (concentrações de 0,25 e 0,5 mg.mL⁻¹) que chegaram ao final do processo de divisão (fase G2), nas células de melanoma murino houve redução em G2 (concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg.mL⁻¹). Esses resultados indicam que MARJ exerceu atividade citostática sobre as células de melanoma, uma vez que foi capaz de frear a divisão celular propriamente dita (fase G2), impedindo, assim, a proliferação celular maligna. O mecanismo de ação para a ocorrência desse tipo de atividade envolve estruturas específicas das células neoplásicas, uma vez que esse efeito citostático não foi observado nas células MDBK.

O ciclo celular divide-se nas fases G1, S e G2 cuja progressão e, conseqüentemente, a divisão celular, é dependente da atuação de genes específicos, que coordenam a atividade de ciclinas e de quinases dependentes de ciclinas (Cdk), as quais só atuam em associação, formando pares regulatórios, próprios de cada fase. (Zuccari et al., 2016). Nesse contexto, o mecanismo de ação do MARJ pode estar relacionado à inibição da expressão de genes responsáveis pelo início da mitose, como p21, p27 e da CDK1 e dos processos enzimáticos subsequentes (Nanni et al., 2020). Semelhantemente à ação de MARJ sobre os eventos regulatórios das fases S e G2 do ciclo celular, outras formulações terapêuticas também inibiram seletivamente a multiplicação celular neoplásica, atuando em sítios como a tirosina quinase WEE1, enzima aurora quinase A (AURK A) e complexo p38/MK2 (Xu & McArthur, 2016).

O composto 4-terpineol, também presente em *Melaleuca alternifolia* freou o ciclo celular em linhagens de melanoma e de mesotelioma humanos e promoveu necrose (Greay et al., 2010). Esse composto é prevalente em MARJ, corroborando com os achados de Greay e colaboradores (2010) em relação ao ciclo celular, embora não tenha promovido necrose. Esse fato pode estar relacionado às diferentes atividades exercidas pelo composto químico isolado e pelo óleo essencial, onde pode haver influência do sinergismo entre os seus componentes (Hajlaoui et al., 2016).

O etoposídeo, fármaco empregado na terapêutica do câncer em humanos, cujo mecanismo de ação compreende a indução do bloqueio pré-mitótico, no final da fase S ou no início da fase G2, através da sua ligação com a enzima topoisomerase II, bloqueando a função enzimática de reparar as fitas de DNA previamente separadas no processo de replicação (Brandão et al., 2010).

Assim como foi observado nas células de melanoma murino para o óleo essencial, o extrato etanólico de *O. majorana* L. também inibiu a proliferação celular e a formação de metástases de células do câncer de mama e pró-apoptótica de leucemia (Abdel-Massih et al, 2010; Dhaheri et al., 2013), mostrando que diferentes extratos dessa planta são antitumorais. No entanto, o óleo de MARJ não induziu à apoptose em melanoma, diferentemente do extrato etanólico (Abdel-Massih et al., 2010; Dhadheri et al., 2014), possivelmente pela diversidade de componentes químicos presentes nos extratos polares e apolares.

4. Conclusões

A atividade antiproliferativa seletiva sobre as células de melanoma demonstraram que o mecanismo de ação de MARJ tem como alvo o ciclo celular. Esse promissor resultado traz a necessidade de estudos futuros para elucidar, especificamente, qual é o ponto da divisão celular em que MARJ atua, visando sua aplicação na terapia antineoplásica.

Outra observação promissora consiste na atividade antioxidante em ambas as linhagens celulares utilizadas, que possibilita ainda o uso de MARJ como adjuvante ao tratamento quimioterápico ou ainda na prevenção da carcinogênese, já que é capaz de proteger as células de danos oxidativos, mesmo em baixas concentrações.

5. Referências bibliográficas

- Abdel-Massih, R. M.; Fares, R.; Bazzi, S.; El-Chami, N.; Baydoun, E. (2010). The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. *Leukemia Research*, 34, 1052-1056.
- American Cancer Society. Cancer facts & figures 2021 – Skin. <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html>
- Arathi, B. P.; Sowmya, P. R.; Kuriakose, G. C.; Vijay, K.; Baskaran, V.; Jayabaskaran, C.; Lakshminarayana, R. (2016). Enhanced cytotoxic and apoptosis inducing activity of lycopene oxidation products in different cancer cell lines. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 265-276.
- Balusamy, S. R.; Perumalsamy, H.; Huq, M. A.; Balasubramanian, B. (2018). Anti-proliferative activity of *Origanum vulgare* inhibited lipogenesis and induced mitochondrial mediated apoptosis in human stomach cancer cell lines. *Biomedicine and pharmacotherapy*, 108, 1835-1844.
- Bayala, B.; Bassole, I. H. N.; Scifo, R.; Gnoula, C.; Morel, L.; Lobaccaro, J. M. A.; Simpure, J. (2014). Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. *American Journal of Cancer Research*, 4(6), 591-607.
- Brandão, H. N.; David, J. P.; Couto, R. D.; Nascimento, J. A. P.; David, J. M. (2010). Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. *Química Nova*, 33(1), 1359 -1369.
- Brasil. (1988). Farmacopéia Brasileira - Volume 1. 4 ed., Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária.
- Bray, F.; Ferlay, J.; Soerjomataram, I.; Siegel, R. L.; Torre, L. A.; Jemal, (2018). A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394-424.
- Del Ré, P. V. & Jorge, N. (2012). Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 14(2), 389-399.
- Dhaheri, Y. A., Attoub, S.; Arafat, K.; Abuqamar, S.; Viallet, J.; Saleh, A.; Agha, H. A.; Eid, A.; Iratni, R. (2013). Anti-Metastatic and Anti-Tumor Growth Effects of *Origanum majorana* on Highly Metastatic Human Breast Cancer Cells: Inhibition of NFκB Signaling and Reduction of Nitric Oxide Production. *PLoS One*, 8(7).
- Domínguez-Rebolledo, A. E., Martínez-Pastor, F., Bisbal, A. F.; Ros-Santaella, J. L; García-Álvarez, O.; Maroto-Morales, A.; Soler, A. J.; Garde, J. J.; Fernández-Santos, M. R. (2010). Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogenperoxide, and importance of individual male variability. *Reproduction in Domestic Animals*, 46, 393-403.

- El-Ashmawy, I. M.; Saleh, A.; Salama, O. M. (2007). Effects of Marjoram Volatile Oil and Grape Seed Extract on Ethanol Toxicity in Male Rats. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 101, 320-327.
- Erdogan, A. & Ozkan, A. (2017). Investigation of Antioxidative, Cytotoxic, Membrane-Damaging and Membrane-Protective Effects of the Essential Oil of *Origanum majorana* and its Oxygenated Monoterpene Component Linalool in Human-Derived Hep G2 Cell Line. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16, 24-34.
- Evenson, D. & Jost, L. (1994). Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. *Methods in Cell Biology*, 42, 159-176.
- Fitzmaurice, C.; Allen, C.; Barber, R. M. (2018). Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. *Journal of American Medical Association Oncology*, 3(4), 524-548.
- Goldschmidt, M. H.; Hendrick, M. J. (2002). Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: Meuten, D.J. Tumors in Domestic Animals. 4 ed. Iowa: Iowa State Press.
- Gray, S. J.; Ireland, D. J.; Kissick, H. T.; Levy, A.; Beilharz, M. W.; Riley, T. V.; Carson, C. F. (2010). Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, 65, 877-888.
- Habibi, E.; Shokrzadeh, M.; Chabra, A.; Naghshvar, F.; Keshavarz-Maleki, R.; Ahmadi, A. (2014). Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. *Pharmaceutical Biology*, 53(1), 1-6.
- Hajlaoui, H.; Mighri, H.; Aouni, M.; Gharsallah, N.; Kadri, A. (2016). Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. *Microbial Pathogenesis*, 95, 86-94.
- Instituto Nacional do Câncer - Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. (2017). Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA.
- Khan, M. S. A.; Ahmad, I.; Cameotra, S. S. (2014). *Carum copiticum* and *Thymus vulgaris* oils inhibit virulence in *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus spp.* *Brazilian Journal of Microbiology*, 45(2), 523-531.
- Mendanha, S. A.; Moura, S. S.; Anjos, J. L. V.; Valadares, M. C.; Alonso, A. (2013). Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. *Toxicology in Vitro*, 27, 323-329.
- Nanni, V.; Di Marco, G.; Sachetti, G.; Canini, A.; Gismondi, A. (2020). Oregano Phytocomplex Induces Programmed Cell Death in Melanoma Lines via Mitochondria and DNA Damage. *Foods*, 9, 1-27.
- Petrunkina, A. M.; Harrison, R. A. (2013) Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. *Reproduction in Domestic Animals*, 48, 11-24.
- Ramadan, G.; El-Beih, N. M.; Zahra, M. M. (2012). Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. *British Journal of Nutrition*, 108, 1059-1068.
- Sharma, M.; Agrawal, S. K.; Sharma, P. R.; Chadha, B. S.; Khosla, M. K.; Saxena, A. K. (2010). Cytotoxic and apoptotic activity of essential oil from *Ocimum viride* towards COLO 205 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 48, 336-344.
- Silva, C. S. 2016. Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK). 2016. 88f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas.
- Silva, C. S.; Guim, T. N.; Fernandes, C. G.; Barboza, D. V.; Cleff, M. B. Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos em cães. (2017). *Clínica Veterinária*, 22(126), 52-60.
- Silva, E. C. B.; Cajueiro, J. F. P.; Silva, S. V.; Soares, V. P.; Guerra, M. M. P. (2012). Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on in vitro evaluation of frozen ram sperm. *Theriogenology*, 77, 1722-1726.
- Soliman, A. M.; Desouky, S.; Marzouk, M.; Sayed, A. A. (2016). *Origanum majorana* Attenuates Nephrotoxicity of Cisplatin Anticancer Drug through Ameliorating Oxidative Stress. *Nutrients*, 8(264), 1-9.
- Tatman, D.; Mo, H. (2002). Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. *Cancer Letters*, 175, 129-139.
- Waller, S. B.; Cleff, M. B.; Mattos, C. B.; Silva, C. C.; Giordani, C.; Lana, D. F. D.; Fuentefria, A. M.; Freitag, R. A.; Sallis, E. S. V.; Mello, J. R. B.; Faria, R. O.; Meireles, M. C. A. (2019). In vivo protection of the marjoram (*Origanum majorana* Linn.) essential oil in the cutaneous sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. *Natural Product and Research*, 17, 1-5.
- Weyden, L.; Brenn, T.; Patton, E. E.; Wood, G. A.; Adams, D. J. (2020). Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma. *The Journal of Pathology*, 252(1), 4-21.
- Xu, W. & Macarthur, G. (2016). Cell Cycle Regulation and Melanoma. *Current Oncology Reports*, v.18, 34, 1-12.
- Zuccari, D. A. P. C.; Jardim-Perassi, B. V.; Lopes, J. R.; Colombo, J.; Silva, C. L. (2016). Biologia do Câncer. In: Daleck, C. R.; De Nardi, A. B. *Oncologia em Cães e Gatos*. 2.ed. Rio de Janeiro: Roca.

4.2 Artigo 2

Avaliação do Efeito Hemolítico do Óleo Essencial de *Origanum majorana* em Diferentes Espécies de Eritrócitos

Cristine Cioato da Silva; Karina Affeldt Guterres; Silvia Regina Leal Ladeira; Tony Picoli; Geferson Fischer; Marlete Brum Cleff

Será submetido à revista Science and Animal Health

AVALIAÇÃO DO EFEITO HEMOLÍTICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ORIGANUM MAJORANA* EM DIFERENTES ESPÉCIES DE ERITRÓCITOS

RESUMO

O objetivo desse estudo foi determinar a toxicidade do óleo essencial de *Origanum majorana* (OEOM) em hemácias caninas, através do teste de hemólise em meio líquido com hemácias ovinas, em meio sólido. Para isso, foi preparada uma suspensão de hemácias caninas a 0,15 % em PBS e adicionados os tratamentos com 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12 e 0,06 mg.mL⁻¹ de OEOM e incubados em estufa por 24 horas, a 37°C. A leitura foi feita por espectrofotometria do líquido sobrenadante. Para o teste em meio sólido, foram utilizadas placas contendo ágar-sangue produzidas com sangue ovino. Nas placas foram colocados discos de papel-filtro estéreis nº1 com 7 mm de diâmetro, nos quais foram colocados 10 µL do óleo essencial nas concentrações de 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12 e 0,06 mg.mL⁻¹ e incubadas por 24 horas a 37°C. A hemólise foi determinada pela medida do halo formado ao redor dos discos, em mm. Em meio líquido, as concentrações de 0,006 e 0,0125 mg.mL⁻¹ apresentaram menores porcentagens de hemólise que as demais. Nas concentrações entre 0,25 e 4 mg.mL⁻¹ obteve-se 100% de hemólise. Em meio sólido, somente a concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ não provocou lise das hemácias ovinas, igualando-se ao controle negativo. Nesse estudo, foi observado que o OEOM mostrou-se tóxico para as células sanguíneas, sendo altamente hemolítico (90 a 100% de hemólise) na maioria das concentrações. Por serem produtos vegetais ricos em terpenos, um possível mecanismo de toxicidade seria a capacidade de desestabilizar a membrana plasmática dessas células, causando a sua ruptura. Devido à elevada toxicidade do OEOM observada, para o prosseguimento dos estudos, é necessário avaliar se as propriedades terapêuticas do OEOM se mantêm mesmo em baixas concentrações. Outra possibilidade é a avaliação dos efeitos dos principais componentes observados em OEOM de forma isolada, a fim de definir sua atividade nos eritrócitos.

Palavras-chave: Hemácias. Citotoxicidade. Cão. Ovino. Lamiaceae.

As espécies de plantas da família Lamiaceae vêm se destacando por serem ricas em substâncias antioxidantes e têm sido amplamente testadas quanto às suas atividades terapêuticas, apresentando resultados promissores (LIMA & CARDOSO, 2007; SAVINI et al, 2009; CLEFF et al., 2010; KONTOGIANNI et al, 2013; SANTIN et al., 2014; SHIRISHA et al, 2014; CATTANEO et al, 2015). Estudos preliminares realizados pelo grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Produtos Naturais na Clínica Médica Veterinária (FITOPEET) tem demonstrado efetividade *in vitro* frente a parasitos, fungos, bactérias e vírus, todos de importância

veterinária (CLEFF et al., 2010; BLANK, 2013; GIORDANI, 2013; MATOS, 2014; GUTERRES 2015; WALLER et al., 2019).

Grande parte da população brasileira utiliza as plantas como única fonte de recursos terapêuticos (MESSIAS et al., 2015). Em populações que possuem acesso reduzido a medicamentos, a utilização dessa prática terapêutica traz diversas vantagens, entre as principais, o baixo custo, fácil acesso e forma de preparação simples (GIORDANI et al., 2016). No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) tem regulamentado o uso de algumas plantas medicinais, devido a estudos científicos comprobatórios de eficácia em determinadas enfermidades e/ou sinais clínicos (BRASIL, 2004).

Assim, para assegurar o uso destas plantas, faz-se necessária a realização de testes de eficácia e segurança utilizando métodos específicos respaldados pela legislação, onde as informações toxicológicas pré-clínicas são obtidas a partir de pesquisas *in vitro* e *in vivo* (BRASIL, 2004; GIORDANI et al, 2016). Visando minimizar o uso de animais nos testes de toxicidade, surgem novas alternativas no âmbito da pesquisa, como o uso de organismos menores e menos desenvolvidos e os testes em cultivos de células (BONES & MOLETO, 2012). A partir disso, a determinação do potencial tóxico dos extratos de plantas torna-se de grande importância, tendo em vista a aplicabilidade dos resultados, pois a toxicidade é um dos principais fatores limitantes para que um extrato vegetal possa ser indicado como medicinal.

Estudos com o óleo essencial de *Origanum majorana* (OEOM) já comprovaram sua atividade como antimicrobiano e antiproliferativos (SANTIN et al., 2014; SILVA, 2016; WALLER et al., 2019). Porém, não existem trabalhos científicos referentes à sua capacidade de causar hemólise, que é um bom parâmetro de avaliação da toxicidade, pois os eritrócitos são um bom modelo de estudo sobre a estabilidade da membrana plasmática e permitem a análise quantitativa desses dados, uma vez que podem ser determinados numericamente por espectrofotometria da quantidade de hemoglobina liberada pela lise celular (FREITAS et al., 2008).

Na composição química do OEOM são frequentemente encontrados terpenos como 4-terpineol, *cis*-sabineno hidratado e o gama-terpineno, que são responsáveis pelas suas propriedades medicinais, mas também pelo seu potencial hemolítico, devido à sua capacidade de interagir com as membrana plasmática. O presente trabalho tem como objetivo determinar o potencial hemolítico do OEOM em diferentes concentrações, em meio líquido com hemácias caninas e em meio sólido, com ágar-sangue de ovino.

As folhas secas de *O. majorana* foram adquiridas de distribuidor comercial, possuindo laudo de certificação botânica. O óleo essencial foi submetido à extração com arraste de vapor, em aparelho Clevenger, durante 4 horas (Farmacopéia Brasileira IV, 1988). Após a extração, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e refrigerado, até a utilização nos testes.

O óleo essencial de manjerona foi submetido a dois ensaios de atividade hemolítica: em meio líquido, com hemácias caninas e em meio sólido, utilizando ágar-sangue de ovino. Esses testes foram aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da UFPel (7044/2015).

1. Atividade hemolítica em meio líquido:

Essa avaliação foi realizada no Laboratório de Virologia e Imunologia da UFPel (LabVir/UFPel). O sangue utilizado no teste foi proveniente de um cão adulto saudável, fêmea, SRD, cujo tutor autorizou a coleta e doação do referido material biológico. A coleta foi realizada em um tubo contendo heparina sódica e o sangue foi submetido a uma primeira centrifugação por 5 minutos a 900 g. O plasma foi removido e as células vermelhas foram ressuspensas em tampão fosfato-salina (PBS) 10%, pH 7,4, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições citadas. Esse processo foi repetido três vezes, resultando em um concentrado de hemácias (hematócrito=100%) que foi diluído em PBS até a concentração de 0,15% (MALHEIROS; MEIRELLES; DE PAULA, 2000).

A suspensão de eritrócitos (0,15%) em solução isotônica (PBS) foi acrescida com o óleo essencial nas concentrações de 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,12 e 0,06 mg.mL⁻¹ e incubadas em estufa por 60 minutos a 37°C. Decorrido esse período, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g e a concentração de hemoglobina no sobrenadante foi determinada espectrofotometricamente a 412 nm de absorvância (Shimadzu UV-160 1 PC). O teste foi realizado em triplicata para cada concentração do óleo essencial de manjerona e também para os controles: C- (eritrócitos em PBS - controle da hemólise mecânica - negativo) e C+ (eritrócitos em água destilada - controle de hemólise total - positivo) (MALHEIROS; MEIRELLES; DE PAULA, 2000).

O efeito hemolítico (% de hemólise) considerado foi a concentração de hemoglobina no sobrenadante, calculada utilizando as médias da triplicata das absorvâncias de cada concentração do OEOM, de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100$$

Em que:

A_a= médias das absorvâncias das amostras

A_{c1}= média da absorvância do controle negativo

A_{c2}=média da absorvância do controle positivo

2. Atividade hemolítica em meio sólido:

O teste de atividade hemolítica em meio sólido foi realizado no Laboratório Regional de Diagnóstico da UFPel (LRD/UFPel). Para esse teste foram utilizadas placas de Petri contendo ágar-sangue, confeccionadas com sangue de ovinos. Sobre essas placas, foram distribuídos discos em papel-filtro estéreis n°1 com 7 mm de diâmetro, nos quais foram colocados 10 µL do óleo essencial nas concentrações de 4, 2, 1, 0,5, 0,25, 0,0125 e 0,006 mg.mL⁻¹, além dos controles positivo (água oxigenada 20 V) e negativo (PBS 10%, pH 7,4), em triplicata. Depois da evaporação dos solventes, as placas foram incubadas a 36°C por 24 horas. Após este período verificou-se a formação de halos de hemólise que foram então medidos e os resultados expressos como a média dos halos em milímetros (KALEGARI et al., 2011).

As análises estatísticas foram feitas pelo software Statistix versão 10.0[®], utilizando a análise de variância (ANOVA) para comparação entre os tratamentos. As médias foram comparadas pelo teste de Tukey, sendo considerados resultados significativos quando p<0,05.

Em meio sólido, somente a concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ não provocou lise das hemácias ovinas, igualando-se ao controle negativo. As demais concentrações apresentaram halos de medidas estatisticamente iguais, sendo maior na concentração de 1 mg.mL⁻¹, diferindo somente do controle negativo e da concentração de 0,5 mg.mL⁻¹ (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados das médias de hemólise em meio sólido (mm) e em meio líquido (%), nas diferentes concentrações de OEOM testadas.

Concentrações OEOM (mg.mL ⁻¹)	Média hemólise meio sólido (mm)	Média hemólise meio líquido (%)
0,006	8,33 ^a	34,26 ^a
0,0125	8,66 ^a	12,58 ^a
0,25	9,66 ^a	100 ^b
0,5	0 ^b	100 ^b
1	10,66 ^a	100 ^b
2	9,66 ^a	100 ^b
4	9,66 ^a	90,9 ^b
0 (C ⁺)*	12 ^a	100 ^b
0 (C ⁻)**	0 ^b	0 ^a

Fonte: DA SILVA, Cristine Cioato

ab= letras diferentes indicam diferença estatística significativa, com $p > 0,01$

*Controle positivo= água oxigenada (H₂O₂)

**Controle negativo= tampão fosfato-salina (PBS)

Em meio líquido, as concentrações de 0,006 e 0,0125 mg.mL⁻¹ apresentaram menores porcentagens de hemólise que as demais. Nas concentrações entre 0,25 e 4 mg.mL⁻¹ obteve-se 100% de hemólise. A observação de precipitado de hemácias nos tubos tratados com as concentrações de 0,006 e 0,0125 mg.mL⁻¹, ilustram esse resultado, uma vez que as células não lisadas encontram-se no fundo, assim como ocorreu com o tubo controle positivo (Figura 1).

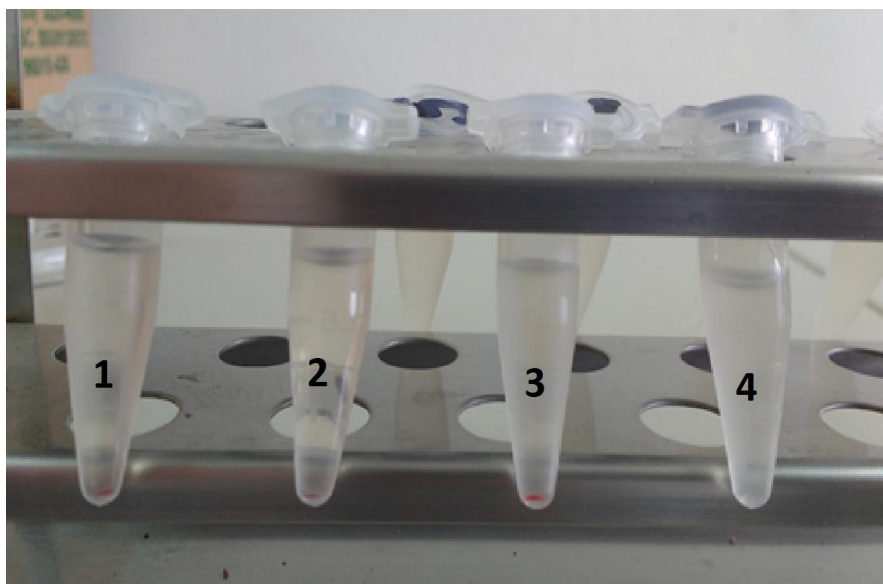


Figura 1. Tubos contendo hemácias tratadas

Fonte: DA SILVA, Cristine Cioato

*com 0,0125 mg.mL⁻¹ (1) e 0,006 mg.mL⁻¹ (2) de OEOM, com PBS (C-) (3) e com água oxigenada (C+) (4). Nota-se no fundo dos tubos 1, 2 e 3 a formação de um precipitado de eritrócitos não hemolisados.

Não foram encontrados estudos de avaliação do potencial hemolítico utilizando óleos essenciais extraídos do *O. majorana*. Porém, outras plantas da família Lamiaceae já foram testadas como o *Thymus vulgaris*, que provocou 25% de hemólise em amostras tratadas com uma concentração de 1,25 mg.mL⁻¹ de óleo essencial (RAMOS et al., 2015), ficando abaixo do obtido no presente estudo, que foi de 100% nas concentrações aproximadas (1 e 2 mg.mL⁻¹). Apesar de serem da mesma família, possivelmente tenham composições químicas diferentes, o que explicaria as diferentes toxicidades. Além disso, a análise subjetiva dos resultados, baseada somente na observação dos autores utilizada por Ramos e colaboradores (2015) também constitui um importante fator para as diferenças obtidas. A mensuração objetiva da hemólise feita pela medida dos halos em ágar-sangue e por espectrofotometria, baseada na quantidade de hemoglobina liberada no meio, mostraram ser métodos adequados para a determinação do potencial hemolítico do OEOM.

As avaliações de triagem toxicológica com extratos vegetais e células sanguíneas de cães são pouco realizadas, sendo mais comumente feitas utilizando hemácias de bovinos, ovinos e humanos (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006; FREITAS et al., 2008; RAMOS et al., 2015). Ainda assim, a avaliação hematológica utilizando extratos de plantas, e/ou seus componentes têm sido rotineiramente empregada como forma de triagem toxicológica em estudos nas áreas de farmacologia e da indústria cosmética, com produtos medicinais de uso tópico e injetável e também com emulsificantes, na agricultura, em produtos fitoterápicos empregados como biopesticidas e também na pecuária, em plantas presentes nas pastagens (BEDNARCZUK et al., 2008; ZHAO, SINGH, 2000; PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006; MANCINI et al., 2014).

A toxicidade dos extratos vegetais está diretamente relacionada à composição e a presença de substâncias que podem provocar diferentes efeitos em pessoas ou animais. Compostos químicos comumente encontrados em plantas como os terpenos, alcaloides, taninos, saponinas e compostos fenólicos, além de conferirem propriedades terapêuticas às plantas medicinais, também são responsáveis pelo seu potencial hemolítico (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006; CARVALHO; OLIVEIRA, 2012; NETO, 2014). Nesse estudo, foi observado que o OEOM mostrou-se tóxico para as células sanguíneas, sendo altamente hemolítico (90 a 100% de hemólise) na maioria das concentrações. Por serem produtos vegetais ricos em terpenos, um possível mecanismo de toxicidade seria a capacidade desses compostos em romper as

ligações de hidrogênio localizadas entre as moléculas lipídicas das membranas celulares, desestabilizando-as (MENDANHA et al., 2013). Tal mecanismo é interessante em produtos farmacêuticos, uma vez que aumentam a fluidez das membranas e facilitam a penetração dos fármacos no interior das células (ZHAO, SINGH, 2000). Por outro lado, em altas concentrações, os terpenos são capazes também de provocar a ruptura das membranas eritrocitárias, causando hemólise (NETO, 2014).

Além da toxicidade celular direta, ainda existem os efeitos deletérios secundários à liberação da hemoglobina em consequência da ruptura das hemácias, frequentemente observados nos rins e coração. Dessa forma, reforça-se a impossibilidade do uso do OEOM nas concentrações de 1, 2 e 4 mg.mL⁻¹ em posteriores testes *in vivo*, bem como sua aplicabilidade como produto medicinal.

Estudos demonstraram uma maior toxicidade do óleo essencial de *Mesophaerum sidifolium*, também da família Lamiaceae, em comparação com seu componente terpênico majoritário isolado, o fenchone (ROLIM et al., 2017). Tal avaliação pode ser aplicada ao presente estudo, como uma alternativa para viabilizar a utilização do potencial terapêutico do OEOM, com menos efeitos tóxicos.

Considerando os resultados, observa-se que apenas as menores concentrações (0,0125 e 0,006 mg.mL⁻¹) do OEOM produziram baixas taxas de hemólise, tanto em meio líquido como em meio sólido. Nas demais concentrações, o OEOM provocou hemólise de modo semelhante aos controles positivos (água oxigenada), sendo, portanto potencialmente tóxico para os eritrócitos caninos e ovinos utilizados.

Dessa forma, para prosseguimento dos estudos, é necessário avaliar se as propriedades terapêuticas do OEOM se mantêm mesmo em baixas concentrações. Outra possibilidade é a avaliação dos efeitos dos principais componentes observados em OEOM de forma isolada, a fim de definir sua atividade nos eritrócitos.

EVALUATION OF THE HEMOLYTIC EFFECT OF THE ESSENTIAL OIL OF ORIGANUM MAJORANA ON DIFFERENT SPECIES OF ERYTHROCYTES

ABSTRACT

The objective of this study was to determine the toxicity of the essential oil of *Origanum majorana* (OEOM) in canine erythrocytes, through the hemolysis test in liquid medium with ovine erythrocytes, in solid medium. For this, a suspension of 0.15% canine red blood cells in

PBS was prepared and treatments with 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 and 0.06 mg.mL⁻¹ of OEOM were added and incubated in an oven for 24 hours at 37 ° C. The reading was made by spectrophotometry of the supernatant liquid. For the test in solid medium, plates containing blood agar produced with sheep blood were used. Sterile filter paper discs number. 1 with 7 mm in diameter were placed on the plates, in which 10 µL of essential oil were placed in concentrations of 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 and 0, 06 mg.mL⁻¹ and incubated for 24 hours at 37 ° C. Hemolysis was determined by measuring the halo formed around the discs, in mm. In a liquid medium, concentrations of 0.006 and 0.0125 mg.mL⁻¹ showed lower percentages of hemolysis than the others. At concentrations between 0.25 and 4 mg.mL⁻¹, 100% hemolysis was obtained. In a solid medium, only the concentration of 0.5 mg.mL⁻¹ did not cause lysis of the red blood cells, equaling the negative control. In that study, it was observed that OEOM was toxic to blood cells, being highly hemolytic (90 to 100% of hemolysis) in most concentrations. As they are plant products rich in terpenes, a possible mechanism of toxicity would be the ability to destabilize the plasma membrane of these cells, causing them to rupture. Due to the high toxicity of OEOM observed, for further studies, it is necessary to assess whether the therapeutic properties of OEOM are maintained even at low concentrations. Another possibility is to assess the effects of the main components observed in OEOM in isolation, in order to define their activity in erythrocytes.

Keywords: Red blood cells. Cytotoxicity. Dog. Sheep. Lamiaceae.

EVALUACIÓN DEL EFECTO HEMOLÍTICO DEL ACEITE ESENCIAL DE *ORIGANUM MAJORANA* EN DIFERENTES ESPECIES DE ERITROCITOS

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue determinar la toxicidad del aceite esencial de *Origanum majorana* (OEOM) en eritrocitos caninos, a través de la prueba de hemólisis en medio líquido con eritrocitos ovinos, en medio sólido. Para esto, se preparó una suspensión de 0.15% de glóbulos rojos caninos en PBS y se agregaron tratamientos con 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 y 0.06 mg.mL⁻¹ de OEOM y se incubó en un horno durante 24 horas a 37 ° C. La lectura se realizó por espectrofotometría del líquido sobrenadante. Para la prueba en medio sólido, se usaron placas que contenían agar sanguíneo producido con sangre de oveja. Se colocaron discos de papel de filtro estéril número. 1 con 7 mm de diámetro en las placas, en las que se colocaron 10 µL de aceite esencial en concentraciones de 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.12 y 0, 06 mg.mL⁻¹ y se incubaron durante 24 horas a 37 ° C. La hemólisis se determinó midiendo el halo formado alrededor de los discos, en mm. En un medio líquido, las concentraciones de 0.006 y 0.0125 mg.mL⁻¹ mostraron porcentajes de hemólisis más bajos que los otros. A concentraciones entre 0.25 y 4 mg.mL⁻¹, se obtuvo 100% de hemólisis. En un medio sólido, solo la concentración de 0.5 mg.mL⁻¹ no causó lisis de los glóbulos rojos, igualando el control negativo. En este estudio, se observó que OEOM demostró ser tóxico para las células sanguíneas, siendo altamente hemolítico (90 a 100% de la hemólisis) en la mayoría de las concentraciones. Debido a que son productos vegetales ricos en terpenos, un posible mecanismo de toxicidad sería la capacidad de desestabilizar la membrana plasmática de estas células, provocando su ruptura. Debido a la alta toxicidad de OEOM observada, para estudios posteriores, es necesario evaluar si las propiedades terapéuticas de OEOM se mantienen incluso a bajas concentraciones. Otra posibilidad es evaluar los efectos de los principales componentes observados en OEOM de forma aislada, para definir su actividad en los eritrocitos.

Palabras clave: glóbulos rojos. Citotoxicidad Perro Oveja Lamiaceae.

Referências Bibliográficas

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Teste *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BLANK, D. Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BONES, V. C.; MOLETO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em Foco**, v.10, n.1, p.103-112, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2011. 126p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE no. 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Poder Executivo. Brasília, DF. 12 de março de 2004.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodron urundeuva* FR. Allemao. **Revista Eletrônica de Biologia**, v.5, n.3, p.1-7, 2012.

MENDANHA, S. A.; MOURA, S. S.; ANJOS, J. L. V.; VALADARES, M. C.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro**, v.27, p.323-329, 2013.

CATTANEO, L.; CICONI, R.; MIGNOGNA, G.; et al. Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. **PLOS ONE**, p.1- 18, 2015.

CLEFF, M. B.; MEINERRZ, A. R.; FARIA, R. O.; XAVIER, M. O.; SANTIM, R.; NASCENTE, P. S.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV – Parte I; 4ª ed., Atheneu: São Paulo; 1988.

FREITAS, M. V.; NETTO, R. C.; COSTA-HUSS, J. C.; SOUZA, T. M.; COSTA, J. O.; FIRMINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, n.22, v.1, p.219-224, 2008.

GIORDANI, C. Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente à *Malassezia pachydermatis*. 2013. 126f. Dissertação (Mestrado Ciências) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GIORDANI, C.; MATOS, C. B.; GUTERRES, K. A.; SILVA, C. C.; SANTIN R.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B. Plantas com potencial medicinal e tóxico em comunidade atendida pelo Ambulatório Veterinário-UFPel. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.23, n.3, p.126-132, 2016.

GUTERRES, K. A. Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae. 2015. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

KALEGARI, M. et al. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KONTOGIANNI, V. G.; TOMIC, G.; NIKOLIC, I. et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, v.136, p.120-129, 2013.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v.3, n.3, 2007.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysics Chemistry**, v.83, n.2, p.89-100, 2000.

MANCINI, E.; CAMELE, I.; ELSHAFIE, H. S.; MARTINO, L.; PELLEGRINO, C.; GRULOVA, D.; DE FEO, V. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare ssp. hirtum* from Different Areas in the Southern Apennines (Italy). **Chemistry & Biodiversity**, v.11, p.639-651, 2014.

MATOS, C. B.. Eficácia de extratos vegetais na desinfecção de superfícies contaminadas com fungos do complexo *Sporothrix*. 83f. 2014. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

MENDANHA-NETO, S. A. **Interações de terpenos com membranas de eritrócito, fibroblasto, estrato córneo e membrana modelo e interações de uma nanopartícula de ouro com membranas modelo**. 2014. 210f. Tese (Doutorado) – Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás.

MESSIAS, M. C. T. B; MENEGATTO, M. F.; PRADO, A. C. C.; SANTOS, B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.1, p. 45-48, 2006.

ROLIM, T. L.; MEIRELES, D. R. P.; BATISTA, T. M.; SOUZA, T. K. G.; MANGUEIRA, V. M.; ABRANTES, R. A.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. C. O.; BATISTA, L. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SOBRAL, M. V. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17, n.347, 2017.

SANTIN, R. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.367-373, 2014.

SAVINI, I.; ARNONE, R.; CATANI, M.V. et al. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer Caco2 cells. **Nutrition and Cancer**, v.61, n.3, p.381–389, 2009.

SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.370, p.1-13, 2015.

SILVA, C. C. **Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK)**. 2016. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas.

WALLER, S. B.; CLEFF, M. B.; MATTOS, C. B.; SILVA, C. C.; GIORDANI, C.; LANA, D. F. D.; FUENTEFRIA, A. M.; FREITAG, R. A.; SALLIS, E. S. V.; MELLO, J. R. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. *In vivo* protection of the marjoram (*Origanum majorana* Linn.) essential oil in the cutaneous sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Natural Product and Research**, n.17, p.1-5, 2019.

ZHAO, K.; SINGH, J. Mechanism(s) of In Vitro Percutaneous Absorption Enhancement of Tamoxifen by Enhancers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, n.6, 2000.

4.3 Artigo 3

Efeito do Óleo Essencial de *Origanum majorana* em Células Espermáticas de *Sus scrofa domesticus*

Cristine Cioato da Silva; Claudia Giordani; Rafael Barbosa Mielke; Antonio Sergio Varela Junior; Carine Dahl Corcini; Rogério Antonio Freitag; Marlete Brum Cleff

Será submetido à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais

**Efeito do óleo essencial de *Origanum majorana* (Linn.) em células
espermáticas de *Sus scrofa domesticus***

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar os efeitos tóxicos do óleo essencial de *Origanum majorana* (OEOM) em espermatozóides suínos. O estudo avaliou a fluidez e integridade da membrana plasmática, potencial de membrana mitocondrial, formação de espécies reativas de oxigênio, lipoperoxidação da membrana plasmática, acrossomas não reagidos e índice de fragmentação de DNA das células espermáticas expostos às concentrações de 0,25, 0,5 e 1 mg.mL⁻¹ de OEOM, por 24 horas e parâmetros relacionados à cinética, como motilidade total e progressiva, amplitude do deslocamento lateral da cabeça, distância média percorrida e frequência do batimento flagelar cruzado das quando resfriadas a 17 °C durante 24 horas e imediatamente após o tratamento com as concentrações de 0,25, 0,5, 1 e 2 mg.mL⁻¹ de OEOM. Em 24 horas os parâmetros motilidade total, motilidade progressiva e distância média percorrida diminuíram em todas as concentrações do OEOM utilizadas, assim como a fluidez da membrana plasmática e o potencial de membrana mitocondrial, possivelmente levando as células espermáticas à infertilidade, devido ao déficit energético e a baixa motilidade. Após 24 de resfriamento, MT e MP diminuíram na concentração de 1 mg.mL⁻¹, porém, em comparação com os resultados da hora zero, todos os parâmetros diminuíram inclusive no controle, denotando uma suscetibilidade dessas células ao resfriamento e também a incapacidade do OEOM como crioconservante, bem como sua toxicidade, principalmente na concentração de 1 mg.mL⁻¹. O óleo essencial de *O. majorana* apesar de apresentar substâncias antioxidantes, como cis-sabineno, 4-terpineol e gama-terpineno, não exerceu

atividade antioxidante/protetiva sobre as células espermáticas de suínos, não reduzindo a produção de ERO e diminuindo a motilidade e capacidade de fertilização destas. Apesar do mecanismo não estar completamente elucidado, é possível afirmar que o OEOM alterou a membrana plasmática e mitocondrial das células.

Palavras-chave: citotoxicidade; plantas medicinais; terpenos; citometria de fluxo; cinética espermática.

Introdução

Origanum majorana, popularmente conhecido e utilizado como condimento, é rico em compostos antioxidantes como os flavonoides e terpenoides, além de fenóis e alcaloides (ABDEL-MASSIH et al., 2010; GARCIA-BELTRÁN & ESTEBAN, 2015). Estudos com o óleo essencial demonstram atividade em patógenos de interesse veterinário e médico (WALLER et al., 2017; WALLER et al., 2019), embora tenha sido pouco explorado em relação ao potencial tóxico (FRESCO et al., 2004; HUANG et al., 2010), e sobre o seu efeito na conservação de sêmen e na capacidade de fertilização.

A pesquisa por moléculas mais eficazes e menos tóxicas, a partir dos produtos naturais e seus derivados tem sido fortemente incentivada e, sendo assim, torna-se necessário que se compreenda os mecanismos de ação dos extratos vegetais nas células, a fim de explorar os possíveis alvos de ação farmacológica (HUANG et al., 2010). Recentemente os testes envolvendo células espermáticas estabeleceram-se como um importante método de triagem toxicológica, uma vez que são de fácil obtenção, utilizando poucos animais doadores e com métodos não invasivos de coleta (VICENTE-CARRILLO et al., 2015, SILVEIRA et al., 2019). Além disso, apresentam sensibilidade semelhante àquela demonstrada pelas células somáticas usualmente

utilizadas, sem necessitar de longos períodos de cultivo e incubação (VICENTE-CARRILLO et al., 2015).

Estudos anteriores demonstraram que as células espermáticas são um modelo adequado para a determinação da toxicidade e do efeito de extratos vegetais (MARTINEZ-LOREDO et al., 2015; GIORDANI et al., 2018). Os espermatozoides são células sensíveis a quaisquer alterações na homeostase, como o desequilíbrio iônico, energético e, principalmente, na função mitocondrial (HOORNSTRA et al., 2003; VICENTE-CARRILLO et al., 2015). Em adição, muitos estudos têm focado na busca por moléculas naturais que possam ser utilizadas para melhorar ou manter a qualidade do sêmen durante o processo de resfriamento, congelamento e descongelamento (MELO MACIEL et al., 2015; PEIXOTO et al, 2017).

Porém, o efeito da adição do óleo essencial de *O. majorana* (OEOM) na cinética e nas estruturas das células espermáticas após seu resfriamento, ainda não foi estudado, sendo esta pesquisa inédita. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade celular de diferentes concentrações do OEOM, através da determinação dos seus efeitos em espermatozóides suínos, bem como sua composição química.

Materiais e métodos

1. Obtenção e preparo do material vegetal

As folhas secas de *O. majorana* foram adquiridas de distribuidor comercial (Lote nº: 00814), possuindo laudo de certificação botânica. A extração do óleo essencial foi realizada de acordo com as orientações da Farmacopéia Brasileira IV (1988), sendo o material vegetal foi submetido à extração com arraste de vapor, em aparelho Clevenger, durante 4 horas. Após a extração, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro, armazenado em frasco âmbar e refrigerado, até a utilização nos testes.

2. Determinação da composição química do óleo essencial de *O. majorana*

Para a identificação dos compostos bioativos do óleo essencial foi utilizado cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas (GC/MS-QP 2010SE-Shimadzu, Japão), equipado com auto injetor AOC-20i. As quantificações foram feitas por área normalizada e as identificações dos compostos pelo espectrômetro de massas, utilizando a biblioteca NIST 8 do GC/MS.

3. Análise da cinética espermática e citometria de fluxo

O estudo foi dividido em duas etapas (experimento 1 e 2), onde foi avaliado inicialmente a ação de diferentes concentrações do óleo essencial de *Origanum majorana* (selecionadas com base em estudo não publicado de atividade antiproliferativa em linhagem neoplásica) na cinética espermática, e a segunda, avaliando o efeito intracelular do OEOM, por citometria de fluxo, sendo utilizadas as concentrações que não apresentaram alteração ou reduziram pouco os parâmetros da cinética espermática.

Para ambos as avaliações foram utilizados dois ejaculados provenientes de três machos suínos (*Suis scrofa domesticus*), totalizando seis ejaculados. Os machos estavam alojados em baias individuais, localizadas na Fazenda da Palma - Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas, e foram coletados pelo método da mão-enluvada. Logo após a coleta o sêmen foi diluído na proporção 1:1 (v/v) em Beltsville Thawing Solution (BTS). Para os tratamentos foi adicionado o OEOM em quatro diferentes concentrações, além do controle negativo (C0 = BTS; C1 = 0,25; C2 = 0,5; C3 = 1; C4 = 2 mg.mL⁻¹), para o experimento 1 e três concentrações, mais o controle negativo (C0 = BTS; C1 = 0,25; C2 = 0,5; C3 = 1 mg.mL⁻¹) para a citometria de fluxo.

A avaliação da cinética espermática foi feita através da análise computadorizada de espermatozoides (CASA) no equipamento Axio Scope A1 Ax10 (Zeiss), com o programa Sperm Vision©. Toda avaliação ocorreu em condições isotérmicas 37°C, sendo realizada média de leitura em 10 campos (≥ 1000 células/campo), avaliando os parâmetros de motilidade total (MT%), motilidade progressiva (MP%), distância média percorrida (DAP - mm), frequência do batimento flagelar cruzado (BCF – Hz) e amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH - mm).

Na avaliação celular por citometria de fluxo (Attune® Acoustic Focusing - Life Technologies), os parâmetros avaliados foram acrossoma não reagido (ANR), integridade de membrana (IM) e fluidez da membrana (F), potencial de membrana mitocondrial (PMM), índice de fragmentação de DNA (IFD), espécies reativas de oxigênio (ERO) e peroxidação lipídica (LPO). Foi utilizado laser violeta ($\lambda = 405$ nm), e as células coradas com Hoechst 33342, exceto a avaliação de DNA (concentração de 16,2 mM), sendo eliminados efeitos não-espermáticos tendo por base o gráfico de dispersão (MARTINEZ-ALBORCIA et al., 2012). Para as leituras foram adicionados 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) sem cálcio (80g de NaCl, 11,5g de KCl, 24g de Na₂HPO₄, 2g de KH₂PO₄ e 1L de água Mili-Q), apresentando 20.000 eventos por análise de esperma com fluxo de 200 células/s; para cada avaliação foram utilizadas sondas fluorescentes específicas, permanecendo por cinco minutos protegidas da luz a 37°C, e posteriormente adicionado 500 µl de PBS sem cálcio. 50 Para avaliar o acrossoma, foram utilizados os corantes de lectina de amendoim (*Arachis hypogaea*) (PNA) associado ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1µg/mL) (FITCPNA), e o iodeto de propídio (IP) (7,3 µM). Espermatozoides reagidos e ou alterados apresentavam FITC-PNA + e IP -, FITC-PNA - e PI +; FITC-PNA + e PI +. O resultado

foi expresso em percentagem de células com acrossoma não alterado (FITC-PNA - e a IP -) (Martinez-Pastor et al., 2006). Já para a integridade de membrana espermática foi adicionado corantes 27 μM carboxifluoresceína diacetato (DFC) (células intactas convertem em substância fluorescente, não retido no citoplasma) e 7,5 μM de iodeto de propídio (IP) (em células danificadas, penetra no núcleo), classificados em não-danificados (DCF+/IP-) e danificados (DCF+/IP+; DCF-/IP+; DCF-/IP-) expressos em % de células não danificadas (Fernández-Gago et al., 2013). A avaliação do DNA foi realizada com o corante acridina laranja (corante+DNA fluoresce verde = intacto, e vermelho alaranjado = danificado). Para esta avaliação, em 10 μL de sêmen foi adicionado 5 μL tampão TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 7,2) por 30 segundos, e 10 μL Triton (0,1% Triton X-100) por 30 segundos, e 5 μL acridina laranja (ácido cítrico 0,037 M, Na_2HPO_4 0,126 M, 0,0011 M de EDTA dissódico, NaCl 0,15 M, pH 6,0) (Evenson e Jost, 1994). As leituras foram realizadas em < 5 min após inserção do acridina laranja, e os resultados expressos em índice de DNA fragmentado (DNA lesado). As espécies reativas de oxigênio (ERO) foram avaliadas utilizando (1 μM) 2'7'diclorofluoresceína diacetato (H2DCF-DA) (fluoresce verde = oxidado), e 7,3 μM de IP (marcador de células danificadas). Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência verde de espermatozoides vivos (IP-) (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2011). A função mitocondrial foi avaliada através da sonda fluorescente rodamina 123 (Rh123) (13 μM), que cora mitocôndrias, emitindo fluorescência verde intensa em mitocôndria com atividade elevada (maior potencial eletroquímico) e PI (7,3 μM). Os espermatozoides intactos foram classificados em elevada (\uparrow fluorescência e \uparrow acúmulo Rh123) e baixa funcionalidade (\downarrow fluorescência e \downarrow acúmulo Rh123), expressos em % celular com \uparrow funcionalidade mitocondrial (Silva et al., 2016). A lipoperoxidação (LPO) foi medida utilizando 0,002

mM C11 BODIPY 581/591 (fluoresce vermelho = sem lipoperoxidação; verde = presença de lipoperoxidação). Os resultados foram expressos através da média de fluorescência verde e vermelha, sendo a leitura realizada após 2 horas, considerada a % de presença de LPO (BALAO DA SILVA et al., 2013).

Para a análise estatística foi utilizado o software Statistix 9.0®, sendo dados com normalidade, foi utilizado o teste ANOVA, teste de Tukey.

Resultados e discussão

O óleo essencial utilizado nesse estudo apresentou os terpenos como constituintes majoritários, sendo o *cis*-sabineno hidratado, o 4-terpineol e o gama-terpineno, os predominantes (Figura 1). Apesar dos terpenos serem relacionados com a atividade antioxidante das plantas aromáticas, como o *O. majorana* (RÉ & JOEGE, 2012), essa propriedade não foi observada neste trabalho, principalmente quando considerados os resultados obtidos nos parâmetros de ERO e LPO.

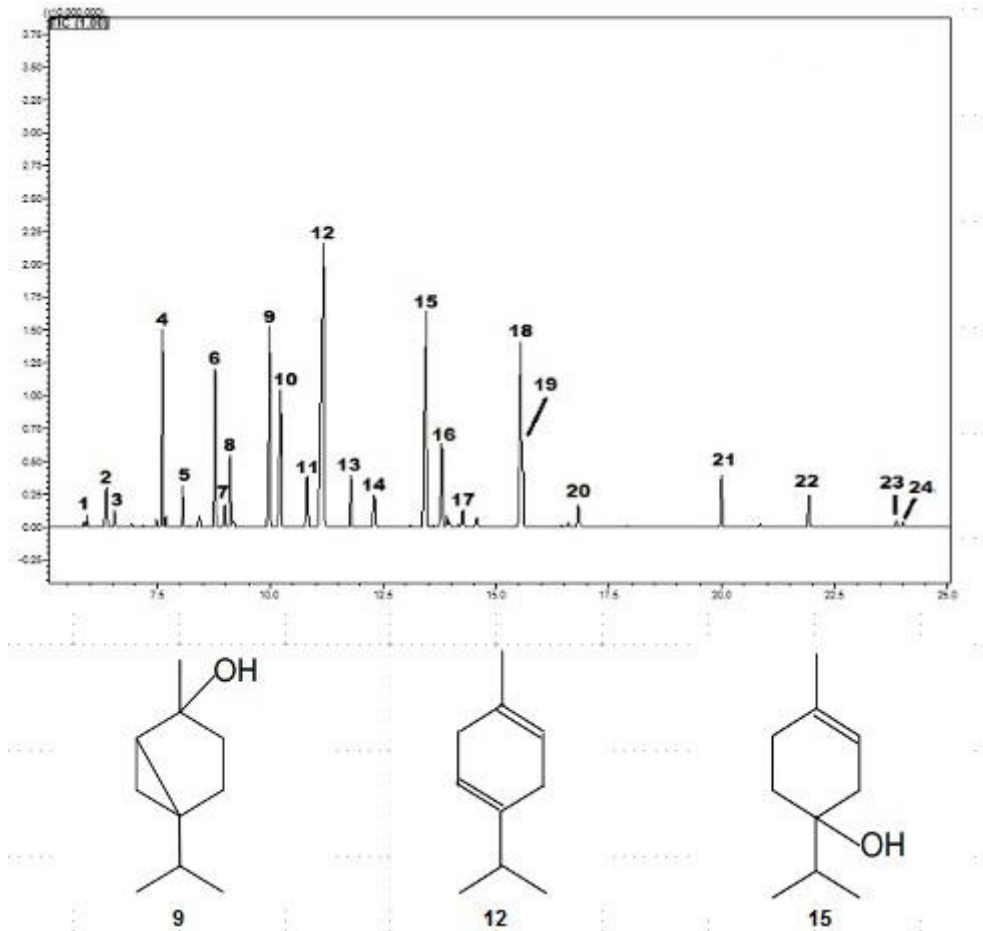


Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de manjerona e ilustração das fórmulas químicas de seus três componentes majoritários.

Fonte: DA SILVA, Cristine Cioato et al.

*Os picos enumerados correspondem aos compostos químicos (tempo de retenção; área). 1 – não identificado (5,92 min.; 0,35%); 2 - α -thujene (6,36 min.; 1,6%), 3 - α -pinene (6,53 min.; 0,61%), 4 - α -phelandrene (7,59 min.; 7,52%), 5 - β -pinene (8,06 min.; 1,43%), 6 - α -terpinene (8,77 min.; 6,13%), 7 - p -cymene (pico 7), 8 - β -phelandrene (9,10 min.; 2,97%), 9 - γ -terpinene (9,98 min.; 8,90%), 10 - trans-sabinenehydrate(10,22min.;6,40%), 11 - δ -2-carene (10,81 min.; 2,01%), 12 - cis-sabinene hydrate (11,16 min.; 22,20%), 13 - não identificado (11,77 min.; 2,09%), 14 - não identificado (12,29 min.; 1,33%), 15 - terpinen-4-ol (13,44 min.; 14,10%), 16 - α -terpineol (13,79 min.; 3,86%), 17 - não identificado (14,25 min.; 0,67%), 18 - não identificado (15,54 min.; 9,90%), 19 - linalool acetate (15,57 min.; 1,92%), 20 - 4-terpinenyl acetate (16,81 min.; 0,93%), 21 - caryophyllene (19,99 min.; 2,43%), 22 - elixene (21,92 min.; 1,47%), 23 - spathulenol (23,86 min.; 0,30%), 24 - não identificado (24,0 min.; 0,17%).

Os óleos essenciais são misturas complexas, com ampla variedade de moléculas, como terpenóides, fenóis e compostos aromáticos (RODRIGUES, 2002; BAYALA et al., 2014). A composição química de um óleo essencial é bastante

variável, de acordo com a origem e a idade da planta, as condições climáticas, a estação do ano, o método de secagem e de extração do óleo, entre outros fatores (SOLIMAN et al., 2009; SAXENO et al., 2016). Essa informação é particularmente importante, pois a composição química do óleo essencial vai influenciar nas suas propriedades terapêuticas e sensoriais, além de desempenhar um papel fundamental na capacidade de penetração e na distribuição do extrato nas células (CAL, 2006; ERDOGAN, OZCAN, 2017).

A presença dos fitoquímicos cis-sabineno hidratado, 4-terpineol e gama-terpineno, que foram majoritários nesse estudo, é frequentemente relatada na composição química do óleo essencial de manjerona, bem como de outras plantas da família Lamiaceae, e os mesmos já foram associados à sua atividade antioxidante, antimicrobiana, antiinflamatória e antiproliferativa (MOSSA; NAWWAR, 2010; ALIZADEH et al., 2011; BINA et al., 2017, HAJLAOUI et al., 2016). O cis-sabineno hidratado é um dos principais responsáveis pelo aroma do óleo essencial de *O. majorana* (NOVAK et al., 2002), porém, não há dados sobre a sua atividade isoladamente. Juntamente com o 4-terpineol, o cis-sabineno hidratado já teve seu potencial antioxidante comprovado (ALIZADEH et al., 2011; KHALED et al., 2014; ELANSARY, 2015; HAJLAOUI et al., 2016). Hajlaoui e colaboradores(2016) estudaram ainda a atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de manjerona cuja composição majoritária era 4-terpineol, cis-sabineno hidratado e gama-terpineno e obtiveram bons resultados frente a 25 tipos de bactérias, 5 espécies de fungos e ainda em células de carcinoma de laringe e adenocarcinoma de cólon. Em outro estudo, o 4-terpineol isoladamente foi capaz de exercer atividade anti-proliferativa, detendo o ciclo celular e ainda provocando necrose em linhagens celulares de melanoma e mesotelioma (GREAY et al., 2010). Embora existam estudos

comprovando a atividade de alguns componentes majoritários das plantas medicinais isoladamente, deve-se considerar a existência de efeitos provocados pelo sinergismo entre esses componentes e os componentes minoritários presentes nos óleos essenciais (HAJLAOUI et al., 2016).

As diferenças existentes na composição química de óleos essenciais obtidos de uma mesma espécie podem justificar a ausência de ação antioxidante apresentada pelo OEOM sobre as células espermáticas, uma vez que não houve redução da produção de ERO e nem de seus efeitos nas estruturas celulares.

Na leitura realizada imediatamente após a exposição do sêmen aos tratamentos (Hora zero) houve redução significativa da motilidade (MT e MP) em relação ao controle desde a concentração de $0,25 \text{ mg.mL}^{-1}$, sendo esta diretamente proporcional ao aumento das concentrações de OEOM. Após 24 horas, MT e MP reduziram em todas as concentrações e também na amostra controle. As mesmas não apresentaram diferença do controle até $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$, ocorrendo redução significativa desses parâmetros a partir da concentração de 1 mg.mL^{-1} .

Na observação da DAP no momento zero hora, percebe-se diminuição do parâmetro com o aumento das concentrações de OEOM ($0,25 \text{ mg.mL}^{-1} \geq 0,5 \text{ mg.mL}^{-1} \geq 1 \text{ mg.mL}^{-1} \geq 2 \text{ mg.mL}^{-1} \geq 4 \text{ mg.mL}^{-1}$) (Tabela 1). Ainda em zero hora, o ALH não foi alterado de maneira significativa em nenhuma das concentrações testadas e no BCF, apenas a concentração de 2 mg.mL^{-1} apresentou redução significativa em relação ao controle.

Tabela 1. Resultados da avaliação das células espermáticas através de análise computadorizada (CASA) após contato com diferentes concentrações do óleo essencial de OEOM em zero e 24 horas de exposição.

Parâmetros	Concentração (mg.mL ⁻¹) Hora 0					
	0 (BTS)	0,25	0,5	1	2	4
MT (%)	72,62±2,88 ^A	50,54±4,89 ^B	54,72±1,55 ^B	37,12±3,58 ^C	10,23±1,97 ^D	9,38±1,63 ^D
MP (%)	53,65±3,08 ^A	35,59±4,78 ^B	28,87±1,48 ^B	10,59±1,77 ^C	4,07±0,69 ^C	3,09±0,50 ^C
DAP (µm/s)	23,13±1,39 ^A	19,19±0,96 ^B	15,48±0,64 ^C	12,51±0,34 ^{CD}	11,89±0,58 ^D	11,49±0,67 ^D
ALH (µm/s)	3,17±0,14 ^{AB}	2,39±0,21 ^{AB}	2,91±0,22 ^B	1,68±0,31 ^{AB}	0,91±0,35 ^A	1,46±0,41 ^{AB}
BCF (Hz)	33,14±1,61 ^A	33,04±2,73 ^{AB}	35,17±1,67 ^{ABC}	20,96±3,40 ^{ABC}	9,80±4,02 ^C	11,12±3,25 ^{ABC}
Parâmetros	Concentração (mg.mL ⁻¹) 24 Horas					
	0 (BTS)	0,25	0,5	1	2	4
MT (%)	24,99±4,47 ^A	27,61±3,43 ^A	23,41±3,33 ^A	11,33±1,16 ^B	4,09±0,69 ^{BC}	2,25±0,51 ^C
MP (%)	11,36±2,46 ^A	11,02±1,55 ^A	10,12±1,99 ^A	3,69±0,59 ^B	1,42±0,28 ^{BC}	0,47±0,24 ^C
DAP (µm/s)	15,66±0,82 ^A	14,83±0,50 ^A	13,13±0,44 ^A	13,77±0,68 ^A	11,71±0,77 ^{AB}	2,82±1,18 ^B
ALH (µm/s)	2,65±0,12 ^{AB}	2,54±0,15 ^{AB}	2,43±0,13 ^{AB}	3,13±0,17 ^A	3,02±0,18 ^A	0,85±0,35 ^B
BCF (Hz)	27,74±1,34 ^A	27,05±1,48 ^A	27,77±1,13 ^A	28,12±1,79 ^A	24,59±1,80 ^A	6,25±2,62 ^B

Fonte: DA Silva, Cristine Ciato.

^{ABCD}Letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre as concentrações na avaliação de um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). BTS: Beltsville Thawing Solution MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, DAP: Distância média percorrida, ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência do batimento flagelar cruzado.

Após 24 horas de exposição aos tratamentos, observou-se a diminuição dos valores de todos os parâmetros avaliados. DAP e BCF apresentaram redução significativa na maior concentração testada (4mg. mL⁻¹), enquanto os valores de ALH, apesar de reduzidos, não diferiram do controle em nenhuma das concentrações de OEOM utilizadas.

Na avaliação das células espermáticas por citometria de fluxo, foi observada uma diminuição significativa na fluidez de membrana nas concentrações de 0,25 e 1 mg.mL⁻¹, em comparação com o controle. Nos demais parâmetros não houve

alteração significativa das células espermáticas com a adição do óleo de *O. majorana* em nenhuma das concentrações utilizadas (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados obtidos a partir da avaliação espermática por citometria de fluxo com a adição diferentes concentrações de OEOM.

Avaliação	Concentração (mg.mL ⁻¹)			
	0 (BTS)	0,25	0,5	1
ANR (%)	73,42±4,94 ^A	75,60±2,92 ^A	77,10±4,5 ^A	74,92±6,26 ^A
IM (%)	27,89±12,94 ^A	28,87±12,16 ^A	36,12±15,65 ^A	27,25±11,03 ^A
IFD	6,67±2,37 ^A	7,18±2,57 ^A	12,68±12,57 ^A	13,74±15,37 ^A
F (%)	26,28±7,67 ^A	16,97±1,89 ^B	19,77±2,75 ^{AB}	17,77±4,95 ^B
ERO	535,55±458,33 ^A	363,75±41,09 ^A	399,75±64,65 ^A	398,00±95,05 ^A
PMM (%)	404,67±800,14 ^A	70,93±2,69 ^B	68,25±3,94 ^B	63,13±8,77 ^B
LPO (%)	42,93±19,21 ^A	39,57±5,05 ^A	42,32±8,64 ^A	39,97±13,15 ^A

Fonte: DA SILVA, Cristiane Ciato.

^{AB}Letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre as concentrações na avaliação de um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). BTS: Beltsville Thawing Solution; ANR: Acrossoma não reagido; IM: Integridade de Membrana; IFD: Índice de fragmentação de DNA; F: Fluidez; ERO: Espécies Reativas de Oxigênio; PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial; LPO: Lipoperoxidação.

Apesar da presença de espécies reativas de oxigênio (ERO) ser necessária para que ocorram os processos espermáticos de hiperativação e capacitação, que são fundamentais para que ocorra a fertilização, níveis elevados de ERO podem provocar danos celulares como a peroxidação lipídica e a fragmentação do DNA, além da perda de motilidade espermática, prejudicando a funcionalidade dessas células (ADEWOYN et al., 2017). Na observação dos resultados, referentes à produção endógena de espécies reativas de oxigênio (ERO), através da citometria de fluxo, não se observa diferença entre as células tratadas com o óleo essencial de *O. majorana* daquelas que não foram tratadas. Sendo assim, a produção de ERO pode ter sido responsável pela redução significativa da fluidez da membrana plasmática, pela redução no potencial

da membrana mitocondrial e pelo aumento no índice de fragmentação de DNA em todas as concentrações de OEOM testadas, mesmo que sem significado estatístico, resultando em alterações funcionais e até mesmo na morte celular, que se refletem diretamente na porcentagem de espermatozoides móveis.

A motilidade espermática é dependente da integridade das mitocôndrias, uma vez que essas estruturas são responsáveis pela produção intracelular de ATP, o qual é utilizado como fonte de energia pelas células (BUCAK et al., 2015). Devido à alta demanda por energia, que é necessária para que os espermatozoides se mantenham ativos até a fertilização, qualquer dano à mitocôndria ou, desequilíbrio na relação produção/consumo de ATP, como ocorre na presença de substâncias tóxicas, pode levar a um prejuízo na sua capacidade reprodutiva (LOPES et al., 2019). Portanto, a redução da funcionalidade mitocondrial, observada nos resultados de PMM das células tratadas com OEOM, pode ter sido a causa da queda da motilidade observada nas células espermáticas.

Em relação à membrana plasmática, apesar de não haver alterações significativas na integridade e na ocorrência de peroxidação lipídica, a redução da fluidez indica uma resposta celular inicial à presença do óleo essencial, ou até mesmo a um desequilíbrio na produção endógena de ERO, uma vez que se trata de uma estrutura muito sensível à oxidação, devido à grande quantidade de ácidos graxos poli-insaturados presentes na sua composição (LUÑO et al., 2015; AITKEN, 2017). Essa alteração na membrana plasmática pode levar à redução na capacidade de fecundação dos espermatozoides após o processo de criopreservação (THOMAS et al., 2006).

Embora os estudos envolvendo o óleo essencial de *O. majorana* sejam escassos, diferentes formulações a base de plantas medicinais vem sendo testadas a fim de minimizar as consequências do estresse oxidativo em células espermáticas, provocado pelo aumento da produção de ERO em situações como o congelamento ou resfriamento celular, uso de substâncias pró-oxidativas e obesidade e de comprovar a sua baixa toxicidade (EL-ASHMAWY et al., 2007; EL-WAKF et al., 2015; EL-WAKF et al., 2019).

Estudos *in vivo* demonstraram a capacidade do óleo essencial de *O. majorana* de recuperar a função reprodutiva de ratos machos que foram induzidos ao estresse oxidativo pela ingestão de etanol, e, conseqüentemente, apresentaram danos reprodutivos (EL-ASHMAWY et al., 2007). A associação dos extratos de *O. majorana* e de semente de uva, normalizou a permeabilidade e solubilidade das membranas celulares, assim como reverteu efeitos deletérios como a redução do peso de testículos, epidídimos e órgãos sexuais, além de aumentar a produção de testosterona, sem exercer nenhum efeito tóxico relevante nos animais utilizados (EL-ASHMAWY et al., 2007). O óleo essencial de *O. majorana* também foi capaz de impedir a degeneração testicular provocada pela dieta rica em gordura, prevenindo os danos causados pela obesidade na fertilidade de ratos machos (EL-WAKF et al., 2015).

Recentemente, El-Wakf e colaboradores (2019) concluíram que o óleo essencial de manjerona e de sálvia, administrados pela via oral nas doses de 16 mL.kg⁻¹ e 0,05 mL.Kg⁻¹, não foram capazes de reduzir a produção de radicais livres, porém, aumentaram a produção de enzimas antioxidantes endógenas, minimizando os danos celulares espermáticos secundários ao estresse oxidativo provocado pela obesidade, como redução da contagem espermática, aumento da peroxidação lipídica

da membrana plasmática, alterações na apoptose e progressão do ciclo celular. Nesse contexto, o trabalho concorda com as observações de El-Wakf (2019), no presente estudo o óleo essencial não exerceu nenhum efeito sobre a produção de radicais livres. Porém, a redução na motilidade espermática observada indica que, ao contrário do que foi visto nos estudos *in vivo*, o óleo essencial de manjerona não é capaz de preservar as células espermáticas dos efeitos do estresse oxidativo *in vitro*, sendo ainda potencialmente tóxico para as mesmas, principalmente em concentrações de 0,5 e 1 mg.mL⁻¹.

No presente estudo, observou-se que as células espermáticas apresentaram redução da motilidade desde a menor concentração testada quando a avaliação foi feita no momento zero de exposição ao OEOM, denotando um efeito tóxico imediato. Já em 24 horas, esse efeito redutor foi observado somente na concentração de 1 mg.mL⁻¹, sendo que nas concentrações de 0,25 e 0,5 mg.mL⁻¹, a motilidade das células tratadas igualou-se estatisticamente ao controle, implicando outros fatores, que não o óleo essencial, como o resfriamento, por exemplo, na redução da motilidade. Nesse tempo de avaliação, observa-se que o óleo essencial não exerceu efeito celular protetivo antes ou após o resfriamento. Ao contrário, Mbaye e colaboradores (2019), observaram efeitos benéficos dos óleos essenciais de orégano e de eucalipto sobre a motilidade *in vitro* de espermatozoides humanos, em espaços curtos de tempo, de 5 e 10 minutos. Porém, ao comparar o efeito dos óleos essenciais entre os diferentes tempos, os autores observaram melhores resultados em 10 minutos de exposição para o eucalipto e em 5 minutos para o orégano. O resultado obtido por Mbaye com o óleo essencial de eucalipto, assemelha-se com o que foi observado no presente estudo, onde o menor tempo de exposição ao óleo essencial

de manjerona levou às maiores reduções de motilidade, quando comparados ao controle, independente da concentração testada.

A exposição imediata com OEOM, possivelmente levou as células espermáticas suínas à diminuição da capacidade de fertilização, uma vez que houve, além da perda da motilidade total e progressiva, redução da distância média percorrida (DAP), principalmente na avaliação imediatamente após a exposição.

Ainda que a capacidade de penetração no óvulo não tenha sido alterada, uma vez que a amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH) foi mantida mesmo nas células tratadas, e que não tenham ocorrido reações acrossomais precoces, os espermatozoides poderiam se tornar inférteis pela incapacidade de deslocarem-se até óvulo. Nas 24 horas de exposição todos os parâmetros avaliados nas células espermáticas diminuíram, inclusive no controle, sendo que a adição de 0,25 e 0,5 mg.mL⁻¹ do óleo, não diferiram do controle em nenhum dos parâmetros de motilidade e DAP, evidenciando que as células espermáticas foram prejudicadas com o método de conservação em que foram mantidas pelo período de 24 horas.

A observação dos resultados obtidos indica que o OEOM pode apresentar propriedades espermicidas, o que seria interessante como método de controle populacional. No entanto, a extrapolação do uso do OEOM para essa aplicação clínica, depende da continuidade dos estudos com a finalidade de elucidar completamente os seus mecanismos de ação, já inicialmente demonstrados nesse trabalho, através das alterações celulares observadas.

Conclusões

O óleo essencial de *O. majorana* apesar de apresentar substâncias antioxidantes, como *cis*-sabineno, 4-terpineol e gama-terpineno, não exerceu

atividade antioxidante/protetiva sobre as células espermáticas de suínos, não reduzindo a produção de ERO e diminuindo a motilidade e capacidade de fertilização destas. Apesar do mecanismo não estar completamente elucidado, é possível afirmar que o OEOM alterou a permeabilidade da membrana plasmática e também as mitocôndrias dos espermatozoides.

Referências bibliográficas

ABDEL-MASSIH, R. M.; FARES, R.; BAZZI, S. et al. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. **Leukemia Research**, v.34, p. 1052-1056, 2010.

ADEWOYIN, M.; IBRAHIM, M.; ROSZAMAN, R.; ISA, M. L. M.; ALEWI, N. A. M; RAFA, A. A. A.; ANUAR, N. M. N. Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytocompounds on Seminal Oxidative Stress. **Diseases**, v.5, n.9, p.1-26, 2017.

AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction Development**, p.1-14, 2017.

ALIZADEH, A.; KHOSH-KHUI, M.; JAVIDNIA, K.; FIRUZI, O.; JOKAR, S. M. Chemical Composition of the Essential Oil, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in *Origanum Majorana* L. (Lamiaceae) Cultivated in Iran. **Advances in Environmental Biology**, v.5,n.8, p.2326-2331, 2011.

BAYALA, B.; BASSOLE, I. H. N.; SCIFO, R.; GNOULA, C.; MOREL, L.; LOBACCARO, J. M. A.; SIMPORE, J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. **American Journal of Cancer Research**, v.4, n.6, p.591-607, 2014.

BINA, F.; RAHIMI, R. Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. **Journal of Evidence-Based**, v.21, n.1, 2017.

BUCAK, M. N.; ATAMAN, M. B.; BASPINAR, N.; UYSAL, O.; TASPINAR, M.; BILGILI, A.; OZTURK,C.; GUNGOR, S.; INANÇ, M. E.; AKAL, E. Lycopene and resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, v.45, n.5, p.545-552, 2015.

CAL, K. Skin Penetration of Terpenes from Essential Oils and Topical Vehicles. **Planta Medica**, v.72, p.311-316, 2006.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E., MARTÍNEZ-PASTOR, F., BISBAL, A.F. et al. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations

of hydrogenperoxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.393-403, 2010.

ELANSARY, H. Chemical Diversity and Antioxidant Capacity of Essential Oils of Marjoram in Northwest Egypt. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.18,n.4, p.917-924, 2015.

ERDOGAN. A.; OZKAN, A. Investigation of Antioxidative, Cytotoxic, Membrane-Damaging and Membrane-Protective Effects of The Essential Oil of *Origanum majorana* and its Oxygenated Monoterpene Component Linalool in Human-Derived Hep G2 Cell Line. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.16, p.24-34, 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV – Parte I; 4^a ed., Atheneu: São Paulo; 1988.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M. P. M. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v.26, n.6, p.747-766, 2006.

GARCÍA-BELTRÁN, J. M.; ESTEBAN, M. A. Properties and Applications of Plants of *Origanum* Sp. Genus. **SM Journal of Biology**, v.2, n.1, p. 1-9, 2016.

GIORDANI, C.; SILVA, C. C.; PERERA, S. C.; BARBOSA, R. M.; PIRES, D. M.; CORCINI, C. D.; VARELA JÚNIOR, A. S.; CLEFF, M. B. EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *Polygonum hydropiperoides* EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Sus scrofa domesticus*. **Science and Animal Health**, v.6, n.1, p.02-19, 2018.

GREAY, S. J.; IRELAND, D. J.; KISSICK, H. T.; LEVY, A.; BEILHARZ, M. W.; RILEY, T. V.; CARSON, C. F. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.65, p.877–888, 2010.

HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; AOUNI, M.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v.95, p.86-94, 2016.

HOORNSTRA, D., ANDERSSON, M. A., MIKKOLA, R. et al. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. **Toxicology In Vitro**, v.17, p.745–751, 2003.

HUANG, W-Y.; CAI, Y-Z.; ZHANG, Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. **Nutrition and Cancer**, v.62, n.1, p.1-20, 2009.

KHALED, S. A.; ABDELLA, E. M.; MOHAMED, G. F. Response of growth, chemical composition, anatomical structure, antioxidant and antimicrobial activity of marjoram to yeast and methionine. **International Journal of Academic Research**, v.6, n.1, p.18-30, 2014.

- LOPES, F. C.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; SÁNCHEZ, J. A. A.; PIRES, D. M.; PEREIRA, J. R.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.; MARTINS, C. M. M. Impacts of the biocide chlorothalonil on biomarkers of oxidative stress, genotoxicity, and sperm quality in guppy *Poecilia vivipara*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.188, 2020.
- LUÑO, V.; GIL, L.; OLACIREGUI, M.; JEREZ, R. A.; BLAS, I.; HOZBOR, F. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa. **Andrologia**, v.49, n.9, p. 1004-1011, 2015.
- MARTINEZ-ALBORCIA, M. J.; MORRELL, J. M.; GIL, M. A.; et al. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 3-4, p. 173-179, 2012.
- MARTINEZ-LOREDO E.; IZQUIERDO-VEGA, J. A.; CARIÑO-CORTES, R.; CILIA-LÓPEZ, V. G.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E. O.; ZUÑIGA-PÉREZ, C.; VALADEZ-VEGA, C.; MORENO, E.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M. EFFECTS of *Heliopsis longipes* ethanolic extract on mouse spermatozoa *in vitro*. **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.2, p.266-271, 2016.
- MARTINEZ-PASTOR, F., MARTÍNEZ, F., GARCÍA-MACÍAS, V. et al. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. **Theriogenology**, v.66, p.1165–1172, 2010.
- MOSSA, A. T. H.; NAWWAR, G. Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of *Origanum majorana* L. essential oil. **Human and Experimental Toxicology**, v.30, n.10, p.1501–1513, 2010.
- NOVAK, J.; BITSCH, C.; PANK, F.; LANGBEHN, J.; FRANZ, C. M. Distribution of the cis-sabinene hydrate acetate chemotype in accessions of marjoram (*Origanum majorana* L.). **Euphytica**, v.127, p.69–74, 2002.
- PEIXOTO, R. M.; ANDRIOLI, A.; SANTOS, D. O.; PINHEIRO, R. R.; ARAÚJO, J. F.; SOUSA, A. L. M.; SILVA, D. F.; DAMASCENO, E. M.; TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação da toxicidade de solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45, n.1487, p. 1-8, 2017.
- RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 163f. 2002. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- SAXENA, D.; JAYANT, S. K.; SONI, K.; NEEKHRA, K. *Origanum majorana*: a Potential Herb for Functional Food. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v.3, n.2, p.321-325, 2016.

SILVA, C. M. B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; et al. Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 241-251, 2013.

SILVA, E. F.; VARELA-JUNIOR, A. S.; CARDOSO, T. F.; et al. Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. **Toxicology in Vitro**, v. 35, p. 31-35, 2016.

SILVEIRA, S.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; DOMINGUES, W. B.; REMIÃO, M.; SANTOS, L.; BARRETO, B.; LESSA, I.; MARTINS, D.; BOYLE, R. T.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R. B.; CAMPOS, V. F. Roundup® Herbicide Decreases Quality Parameters of Spermatozoa of Silversides Odontesthes Humensis. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.102, n.1, p.1-6, 2019.

SOLIMAN, A. M.; DESOUKY, S.; MARZOUK, M.; SAYED, A. A. *Origanum majorana* Attenuates Nephrotoxicity of Cisplatin Anticancer Drug through Ameliorating Oxidative Stress. **Nutrients**, v.8, n.264; p.1-9, 2016.

VICENTE-CARRILLO, A.; EDEBERT, I.; GARSIDE, H.; COTGREAVE, I.; RIGLER, R.; LOITTO, V.; MAGNUSSON, K. E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: implications for drug toxicity testing and the 3R principles. **Toxicology In Vitro**, v.29, n.3, p.582-591, 2015.

WALLER, S. B.; CLEFF, M. B.; MATTOS, C. B.; SILVA, C. C.; GIORDANI, C.; LANA, D. F. D.; FUENTEFRIA, A. M.; FREITAG, R. A.; SALLIS, E. S. V.; MELLO, J. R. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. *In vivo* protection of the marjoram (*Origanum majorana* Linn.) essential oil in the cutaneous sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Natural Product and Research**, n.17, p.1-5, 2019.

5 Considerações Finais

O óleo essencial de *Origanum majorana* utilizado nesse estudo é composto predominantemente por terpenos, sendo o gama-terpineno, cis-sabineno hidratado e o 4-terpineol, os componentes químicos majoritários. Apesar do reconhecido potencial antioxidante dessas substâncias, o OEOM não influenciou na formação de espécies reativas de oxigênio e ainda causou alterações na permeabilidade de membrana plasmática e na membrana mitocondrial das células espermáticas suínas, resultando em alterações cinéticas que promoveram a diminuição da motilidade e da capacidade de fertilização, sendo tóxico para esse tipo celular, principalmente em altas concentrações.

O OEOM também demonstrou toxicidade nos testes com eritrócitos, onde provocou hemólise total em cinco das sete concentrações testadas, tanto em meio líquido, quanto em meio sólido. Nas menores concentrações de OEOM não houve lise celular, o que viabiliza a continuidade da pesquisa a partir dessas concentrações.

Em células neoplásicas (linhagem B16F10), o OEOM interferiu na passagem da fase S para a fase G2 do ciclo celular, demonstrando efeito citostático e reduzindo a multiplicação desse tipo celular. Nas duas linhagens celulares estudadas, o OEOM atuou como antioxidante, reduzindo a produção de ERO e protegendo a membrana plasmática da oxidação lipídica.

Os resultados obtidos direcionam para a continuidade dos estudos sobre o potencial terapêutico do OEOM, pois ainda é necessária a elucidação completa do mecanismo de ação que resultou na sua atividade antiproliferativa seletiva para as células neoplásicas.

A partir dos testes de triagem toxicológica *in vitro* realizados, foi possível concluir que o prosseguimento dessa pesquisa é viável com a utilização de baixas concentrações do OEOM, nas quais a toxicidade é baixa e ainda se mantém as suas propriedades terapêuticas. Além disso, o isolamento dos seus compostos químicos e subsequentes testes de atividade e toxicidade isolados também são promissoras fontes de pesquisa.

Referências

- ABDEL-MASSIH, R. M.; FARES, R.; BAZZI, S.; EL-CHAMI, N.; BAYDOUN, E. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. **Leukemia Research**, v.34, p.1052-1056, 2010.
- ACOSTA, I. B.; VARELA JUNIOR, A. S.; SILVA, E. F.; CARDOSO, T. F.; CALDAS, J. S.; JARDIM, R. D.; CORCINI, C. D. Effects of exposure to cadmium in sperm cells of zebrafish, *Danio rerio*. **Toxicology Reports**, v.3, p.696-700, 2016.
- ADEWOYIN, M.; IBRAHIM, M.; ROSZAMAN, R.; ISA, M. L. M.; ALEWI, N. A. M.; RAFA, A. A. A.; ANUAR, N. M. N. Male Infertility: The Effect of Natural Antioxidants and Phytochemicals on Seminal Oxidative Stress. **Diseases**, v.5, n.9, p.1-26, 2017.
- AITKEN, R. J. Reactive oxygen species as mediators of sperm capacitation and pathological damage. **Molecular Reproduction Development**, p.1-14, 2017.
- ALIZADEH, A.; KHOSH-KHUI, M.; JAVIDNIA, K.; FIRUZI, O.; JOKAR, S. M. Chemical Composition of the Essential Oil, Total Phenolic Content and Antioxidant Activity in *Origanum Majorana* L. (Lamiaceae) Cultivated in Iran. **Advances in Environmental Biology**, v.5, n.8, p.2326-2331, 2011.
- AMERICAN CANCER SOCIETY. Cancer facts & figures – Skin. 2021. Disponível em: <https://www.cancer.org/research/cancer-facts-statistics/all-cancer-facts-figures/cancer-facts-figures-2021.html>
- ANDERSSON, M. A.; HAKULINEN, P.; HONKALAMPI-HAAMALAINEN, U.; HOORNSTRA, D.; LHUGUENOT, J. C.; MAKI-PAKKANEN, J.; SAVOLAINEN, M.; SEVERIN, I.; STAMMATI, A. L.; TURCO, L.; WEBER, A.; VON WRIGHT, A.; ZUCCO, F.; SALKINOJA-SALONEN, M. Toxicological profile of cereulide, the *Bacillus cereus* emetic toxin, in functional assays with human, animal and bacterial cells. **Toxicon**, v.49, p.351–367, 2007.
- ARATHI, B. P.; SOWMYA, P. R.; KURIAKOSE, G. C.; VIJAY, K.; BASKARAN, V.; JAYABASKARAN, C.; LAKSHMINARAYANA, R. Enhanced cytotoxic and apoptosis inducing activity of lycopene oxidation products in different cancer cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v.97, p.265-276, 2016.
- BAÂTOUR, O.; TARCHOUNE, I.; MAHMOUDI, H.; NASSRI, N.; ABIDI, W.; KADDOUR, R.; HAMDAR, G.; NASRI-AYACHI, M. B.; LACHAËL, M.; MARZOUK, B. Culture conditions and salt effects on essential oil composition of sweet marjoram (*Origanum majorana*) from Tunisia. **Acta Pharmaceutica**, v.62, p.251–261, 2012.
- BALUSAMY, S. R.; PERUMALSAMY, H.; HUQ, M. A.; BALASUBRAMANIAN, B. Anti-proliferative activity of *Origanum vulgare* inhibited lipogenesis and induced

mitochondrial mediated apoptosis in human stomach cancer cell lines. **Biomedicine and pharmacotherapy**, n.108, p.1835-1844, 2018.

BAYALA, B.; BASSOLE, I. H. N.; SCIFO, R.; GNOULA, C.; MOREL, L.; LOBACCARO, J. M. A.; SIMPORE, J. Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review. **American Journal of Cancer Research**, v.4, n.6, p.591-607, 2014.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Teste *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BERGSTEIN, T. G.; WEISS, R. R.; BICUDO, S. D. Técnicas de Análise de Sêmen. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.38, n.4, p.189-194, 2014.

BINA, F.; RAHIMI, R. Sweet Marjoram: A Review of Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Biological Activities. **Journal of Evidence-Based**, v.21, n.1, 2017.

BLANK, D. Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

BONES, V. C.; MOLETO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em Foco**, v.10, n.1, p.103-112, 2012.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.1, p.1359 -1369, 2010.

BRASIL.. Farmacopéia Brasileira - Volume 1. 4 ed., Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 1988.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011. 126p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE no. 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Poder Executivo. Brasília, DF. 12 de março de 2004.

BRAY, F.; FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; SIEGEL, R. L.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA: **A Cancer Journal for Clinicians**, v.68, n.6, p.394-424, 2018.

BUCAK, M. N.; ATAMAN, M. B.; BASPINAR, N.; UYSAL, O.; TASPINAR, M.; BILGILI, A.; OZTURK, C.; GUNGOR, S.; INANÇ, M. E.; AKAL, E. Lycopene and

resveratrol improve post-thaw bull sperm parameters: sperm motility, mitochondrial activity and DNA integrity. **Andrologia**, v.45, n.5, p.545-552, 2015.

BUKOWSKA, B.; KOWALSKA, S. Phenol and catechol induce prehemolytic and hemolytic changes in human erythrocytes. *Toxicology Letters*, v.152, n.1, p.73-84, 2004.

CAL, K. Skin Penetration of Terpenes from Essential Oils and Topical Vehicles. **Planta Medica**, v.72, p.311-316, 2006.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, v.3, n.2, p.44-75, 2014.

CARVALHO, M. S.; OLIVEIRA, D. A. Estudo da atividade citotóxica de *Myracrodruon urundeuva* FR. Allemão. **Revista Eletrônica de Biologia**, v.5, n.3, p.1-7, 2012.

CATTANEO, L.; CICONI, R.; MIGNOGNA, G.; et al. Anti-proliferative effect of *Rosmarinus officinalis* L. extract on human melanoma A375 cells. **PLOS ONE**, p.1-18, 2015.

CLEFF, M. B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária, com ênfase em *Candida spp.*** 2008. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; FARIA, R. O.; XAVIER, M. O.; SANTIM, R.; NASCENTE, P. S.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, 2010.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p.170–175, 2000.

DEL RÉ, P. V. & JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.2, p.389-399, 2012.

DHAHERI, Y. A., ATTOUB, S.; ARAFAT, K.; ABUQAMAR, S.; VIALLET, J.; SALEH, A.; AGHA, H. A.; EID, A.; IRATNI, R. Anti-Metastatic and Anti-Tumor Growth Effects of *Origanum majorana* on Highly Metastatic Human Breast Cancer Cells: Inhibition of NFκB Signaling and Reduction of Nitric Oxide Production. **PLOS One**, v.8, n.7, 2013.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A. E., MARTÍNEZ-PASTOR, F., BISBAL, A. F.; ROS-SANTAELLA, J. L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A. J.; GARDE, J. J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M. R. Response of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogenperoxide, and importance

of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, p.393-403, 2010.

ELANSARY, H. Chemical Diversity and Antioxidant Capacity of Essential Oils of Marjoram in Northwest Egypt. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v.18, n.4, p.917-924, 2015.

EL-ASHMAWY, I. M.; SALEH, A.; SALAMA, O. M. Effects of Marjoram Volatile Oil and Grape Seed Extract on Ethanol Toxicity in Male Rats. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.101 p.320-327, 2007.

ERDOGAN. A.; OZKAN, A. Investigation of Antioxidative, Cytotoxic, Membrane-Damaging and Membrane-Protective Effects of The Essential Oil of *Origanum majorana* and its Oxygenated Monoterpene Component Linalool in Human-Derived Hep G2 Cell Line. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.16, p.24-34, 2017.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. **Methods in Cell Biology**, v.42, p.159-176, 1994.

FARMACOPEIA BRASILEIRA IV – Parte I; 4^a ed., Atheneu: São Paulo; 1988.

FERNANDES, S. D. C. Plantas medicinais: Risco e Toxicidade. In: SANTOS, J. S.; ALMEIDA, C. C. O. F. Das plantas medicinais à fitoterapia: uma ciência em expansão. Brasília: Editora IFB, 2016.

FITZMAURICE, C.; ALLEN, C., BARBER, R. M. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-years for 32 Cancer Groups, 1990 to 2015: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **Journal of American Medical Association Oncology**, v.3, n.4, p.524-548, 2018.

FREITAS, M. V.; NETTO, R. C.; COSTA-HUSS, J. C.; SOUZA, T. M.; COSTA, J. O.; FIRMINO, C. B.; PENHA-SILVA, N. Influence of aqueous crude extracts of medicinal plants on the osmotic stability of human erythrocytes. **Toxicology In Vitro**, n.22, v.1, p.219-224, 2008.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUES, M. P. M. New Insights on the Anticancer Properties of Dietary Polyphenols. **Medicinal Research Reviews**, v.26, n.6, p.747-766, 2006.

FRIDOVICH, I. The Biology of Oxygen Radicals. **Science**, v.8, p.875-880, 1978.

FUKUMASU, H.; LATORRE, A. O.; BACCI, N.; GÓRNIK, . L. DAGLI, M. L. Z. Fitoterápicos e potenciais interações medicamentosas na terapia do câncer. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v.21 n.2, p.49-59, 2008.

GARCÍA-BELTRÁN, J. M.; ESTEBAN, M. A. Properties and Applications of Plants of *Origanum* Sp. Genus. **SM Journal of Biology**, v.2, n.1, p. 1-9, 2016.

GIORDANI, C. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente à *Malassezia pachydermatis***. 2013. 126f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

GIORDANI, C.; MATOS, C. B.; GUTERRES, K. A.; SILVA, C. C.; SANTIN R.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B. Plantas com potencial medicinal e tóxico em comunidade atendida pelo Ambulatório Veterinário-UFPel. **Revista Brasileira de Ciências Veterinárias**, v.23, n.3, p.126-132, 2016.

GIORDANI, C.; SILVA, C. C.; PERERA, S. C.; BARBOSA, R. M.; PIRES, D. M.; CORCINI, C. D.; VARELA JÚNIOR, A. S.; CLEFF, M. B. EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE *Polygonum hydropiperoides* EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS DE *Sus scrofa domesticus*. **Science and Animal Health**, v.6, n.1, p.02-19, 2018.

GOLDSCHMIDT, M. H.; HENDRICK, M. J. Tumors of the Skin and Soft Tissues. In: Meuten, D.J. **Tumors in Domestic Animals**. 4 ed. Iowa: Iowa State Press, 2002.

GONÇALVES, H. P. **Determinação da atividade citotóxica in vitro de compostos fitoquímicos e associações em células MDBK e de melanoma (B16F10)**. 2019. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

GREAY, S. J.; IRELAND, D. J.; KISSICK, H. T.; LEVY, A.; BEILHARZ, M. W.; RILEY, T. V.; CARSON, C. F. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy Pharmacology**, v.65, p.877–888, 2010.

GUTERRES, K. A. **Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae**. 2015. 97f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

HABIBI, E.; SHOKRZADEH, M.; CHABRA, A.; NAGHSHVAR, F.; KESHAVARZ-MALEKI, R.; AHMADI, A. Protective effects of *Origanum vulgare* ethanol extract against cyclophosphamide-induced liver toxicity in mice. **Pharmaceutical Biology**, v.53, n.1, p.1-6, 2014.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; AOUNI, M.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v.95, p.86-94, 2016.

HOORNSTRA, D., ANDERSSON, M. A., MIKKOLA, R. et al. A new method for in vitro detection of microbially produced mitochondrial toxins. **Toxicology In Vitro**, v.17, p.745–751, 2003.

HUANG, W-Y.; CAI, Y-Z.; ZHANG, Y. Natural Phenolic Compounds From Medicinal Herbs and Dietary Plants: Potential Use for Cancer Prevention. **Nutrition and Cancer**, v.62, n.1, p.1-20, 2009.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; RASHEED, S. et al. Composition, antioxidante and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.21, n.6, p.943-952, 2011.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: INCA, 2017.

JONES, T. C.; HUNT, R. D., KING, N. W. Células: morte das células e dos tecidos. In: JONES, T. C.; HUNT, R. D., KING, N. W. **Patologia Veterinária**. 1.ed. São Paulo: Manole, 2000.

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

KALB, A. C.; KALB, A. L.; CARDOSO, T. F.; FERNANDES, C. G.; CORCINI, C. D.; VARELA JUNIOR, A. S.; MARTÍNEZ, P. L. Maternal transfer of bisphenol A during nursing causes sperm impairment in male offspring. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, v.70, n.4, p.793-801, 2016.

KALEGARI, M. et al. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch. (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 3, p. 635-642, 2011.

KHALED, S. A.; ABDELLA, E. M.; MOHAMED, G. F. Response of growth, chemical composition, anatomical structure, antioxidant and antimicrobial activity of marjoram to yeast and methionine. **International Journal of Academic Research**, v.6, n.1, p.18-30, 2014.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I.; CAMEOTRA, S. S. *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* oils inhibit virulence in *Trichophyton rubrum* and *Aspergillus spp.* **Brazilian Journal of Microbiology**, v.45, n.2, p.523-531, 2014.

KONTOGIANNI, V. G.; TOMIC, G.; NIKOLIC, I. et al. Phytochemical profile of *Rosmarinus officinalis* and *Salvia officinalis* extracts and correlation to their antioxidant and anti-proliferative activity. **Food Chemistry**, v.136, p.120-129, 2013.

KWON, K. H.; BARVE, A.; YU, S.; HUANG, M T.; KONG, A. N. T. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.28, n.9, p.1409-1421, 2007.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante. **Revista Fitos**, v.3, n.3, 2007.

LOPES, F. C.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; SÁNCHEZ, J. A. A.; PIRES, D. M.; PEREIRA, J. R.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.; MARTINS, C. M. M. Impacts of the biocide chlorothalonil on biomarkers of oxidative stress, genotoxicity, and sperm quality in guppy *Poecilia vivipara*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.188, 2020.

LOPEZ-LAZARO, M. Dual role of hydrogen peroxide in cancer: Possible relevance to cancer chemoprevention and therapy. **Cancer Letters**, v.252 p.1–8, 2007.

LUÑO, V.; GIL, L.; OLACIREGUI, M.; JEREZ, R. A.; BLAS, I.; HOZBOR, F. Antioxidant effect of lemon balm (*Melissa officinalis*) and mate tea (*Ilex paraguensis*) on quality, lipid peroxidation and DNA oxidation of cryopreserved boar epididymal spermatozoa. **Andrologia**, v.49, n.9, p. 1004-1011, 2015.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MALHEIROS, S. V. P.; MEIRELLES, N. C.; DE PAULA, E. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysics Chemistry**, v.83, n.2, p.89-100, 2000.

MANCINI, E.; CAMELE, I.; ELSHAFIE, H. S.; MARTINO, L.; PELLEGRINO, C.; GRULOVA, D.; DE FEO, V. Chemical Composition and Biological Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare ssp. hirtum* from Different Areas in the Southern Apennines (Italy). **Chemistry & Biodiversity**, v.11, p.639-651, 2014.

MARTINEZ-ALBORCIA, M. J.; MORRELL, J. M.; GIL, M. A.; et al. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 140, n. 3-4, p. 173-179, 2012.

MARTINEZ-LOREDO E.; IZQUIERDO-VEGA, J. A.; CARIÑO-CORTES, R.; CILIA-LÓPEZ, V. G.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E. O.; ZUÑIGA-PÉREZ, C.; VALADEZ-VEGA, C.; MORENO, E.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M. EFFECTS of *Heliopsis longipes* ethanolic extract on mouse spermatozoa *in vitro*. **Pharmaceutical Biology**, v.54, n.2, p.266-271, 2016.

MARTINEZ-PASTOR, F., MARTÍNEZ, F., GARCÍA-MACÍAS, V. et al. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. **Theriogenology**, v.66, p.1165–1172, 2010.

MATOS, C. B. **Eficácia de extratos vegetais na desinfecção de superfícies contaminadas com fungos do complexo *Sporothrix***. 2014. 83f. Dissertação

(Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

MATOS, D. L.; ARAÚJO, A. A.; ROBERTO, I. G.; TONIOLLI, R. Análise computadorizada de espermatozoides: revisão de literatura. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.32, n.4, p.225-232, 2008.

MEHREEN, A.; WAHEED, M.; LIAQAT, I.; ARSHAD, N. Phytochemical, Antimicrobial, and Toxicological Evaluation of Traditional Herbs Used to Treat Sore Throat. **BioMed Research International**, v.2016, p.1-9 2016.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, A. L. C.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p.1-14, 2011.

MENDANHA, S. A.; MOURA, S. S.; ANJOS, J. L. V.; VALADARES, M. C.; ALONSO, A. Toxicity of terpenes on fibroblast cells compared to their hemolytic potential and increase in erythrocyte membrane fluidity. **Toxicology in Vitro**, v.27, p.323-329, 2013.

MENDANHA, S. A.; MOURA, S. S.; ANJOS, J. L. V.; VALADARES, M. C.; ALONSO, A. **Interações de terpenos com membranas de eritrócito, fibroblasto, estrato córneo e membrana modelo e interações de uma nanopartícula de ouro com membranas modelo**. 2014. 210f. Tese (Doutorado) – Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás.

MESSIAS, M. C. T. B; MENEGATTO, M. F.; PRADO, A. C. C.; SANTOS, B. R.; GUIMARÃES, M. F. M. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.17, n.1, p.76-104, 2015.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento Racional De Fármacos Baseado em Produtos Naturais. **Química Nova**, v.24, n. 1, p.105-111, 2001.

MORAES, L.G.; ALONSO, A. M.; OLIVEIRA-FILHO, E. C. Plantas medicinais no tratamento do câncer: uma breve revisão de literatura. **Universitas: Ciências da Saúde**, v.9, n.1, 2011.

MORALES, Marcelo M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

MOSSA, A. T. H.; NAWWAR, G. Free radical scavenging and antiacetylcholinesterase activities of *Origanum majorana* L. essential oil. **Human and Experimental Toxicology**, v.30, n.10, p.1501–1513, 2010.

- MOUHID, L.; GÓMEZ DE CEDRÓN, M.; VARGAS, T.; GARCÍA-CARRASCOSA, E.; HERRANZ, N.; GARCÍA-RISCO, M.; REGLERO, G.; FORNARI, T.; RAMÍREZ DE MOLINA, A. Identification of antitumoral agents against human pancreatic cancer cells from Asteraceae and Lamiaceae plant extracts. **BMC Complementary And Alternative Medicine**, v.18, n.1, 2018.
- NAGHAVI, M. et al. The Global Burden of Cancer 2013. **Journal of American Medical Association Oncology**, v.1, n.4, p.505-527, 2015.
- NANNI, V.; DI MARCO, G.; SACHETTI, G.; CANINI, A.; GISMONDI, A. Oregano Phytocomplex Induces Programmed Cell Death in Melanoma Lines via Mitochondria and DNA Damage. **Foods**, v.9, p.1-27, 2020.
- NOVAK, J.; BITSCH, C.; PANK, F.; LANGBEHN, J.; FRANZ, C. M. Distribution of the cis-sabinene hydrate acetate chemotype in accessions of marjoram (*Origanum majorana* L.). **Euphytica**, v.127, p.69–74, 2002.
- OLIVEIRA, L.A.R.; MACHADO, R.D.; RODRIGUES, A.J.L. Levantamento sobre o uso de plantas medicinais com a terapêutica anticâncer por pacientes da Unidade Oncológica de Anápolis. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.1, p.32-40, 2014.
- PEIXOTO, R. M.; ANDRIOLI, A.; SANTOS, D. O.; PINHEIRO, R. R.; ARAÚJO, J. F.; SOUSA, A. L. M.; SILVA, D. F.; DAMASCENO, E. M.; TEIXEIRA, M. F. S. Avaliação da toxicidade de solvente de extratos vegetais com ação antiviral em sêmen caprino refrigerado. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.45, n.1487, p. 1-8, 2017.
- PEQUENO, N. F.; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade in vitro de plantas tóxicas: avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.1, p. 45-48, 2006.
- PETRUNKINA, A. M.; HARRISON, R. A. Fluorescence technologies for evaluating male gamete (dys)function. **Reproduction in Domestic Animals**, n.48, p.11-24, 2013.
- PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p.193-210, 2001.
- RAMADAN, G.; EL-BEIH, N. M.; ZAHRA, M. M. Egyptian sweet marjoram leaves protect against genotoxicity, immunosuppression and other complications induced by cyclophosphamide in albino rats. **British Journal of Nutrition**, v.108, p.1059–1068, 2012.
- RODRIGUES, M. R. A. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 163f. 2002. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

ROLIM, T. L.; MEIRELES, D. R. P.; BATISTA, T. M.; SOUZA, T. K. G.; MANGUEIRA, V. M.; ABRANTES, R. A.; PITA, J. C. L. R.; XAVIER, A. L.; COSTA, V. C. O.; BATISTA, L. M.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SOBRAL, M. V. Toxicity and antitumor potential of *Mesosphaerum sidifolium* (Lamiaceae) oil and fenchone, its major component. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.17, n.347, 2017.

SAALFELD, G. Q.; VARELA JUNIOR, A. S.; CASTRO, T.; PIRES, D. M.; PEREIRA, J. R.; PEREIRA, F. A.; CORCINI, C. D.; COLARES, E. P. Atrazine exposure in gestation and breastfeeding affects *Calomys laucha* sperm cells. **Environmental Science and Pollution Research**, v.26, n.34, p.34953-34963, 2019.

SANTIN, R. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.367-373, 2014.

SARER, E.; SCHEFFER, J. J. C.; SVENDSEN, A. B. Monoterpenes in the Essential Oil of *Origanum majorana*. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.46, p.236-239, 1982.

SAVINI, I.; ARNONE, R.; CATANI, M.V. et al. *Origanum vulgare* induces apoptosis in human colon cancer Caco2 cells. **Nutrition and Cancer**, v.61, n.3, p.381–389, 2009.

SAXENA, D.; JAYANT, S. K.; SONI, K.; NEEKHRA, K. *Origanum majorana*: a Potential Herb for Functional Food. **European Journal of Pharmaceutical and Medical Research**, v.3, n.2, p.321-325, 2016.

SCHIFFMAN, J. D.; BREEN, M. Comparative oncology: what dogs and other species can teach us about humans with cancer. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v.370, p.1-13, 2015.

SHARMA, M.; AGRAWAL, S. K.; SHARMA, P. R.; CHADHA, B. S.; KHOSLA, M. K.; SAXENA, A. K. Cytotoxic and apoptotic activity of essential oil from *Ocimum viride* towards COLO 205 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.336–344, 2010.

SHERR, C. J.; BARTEK, J. Cell Cycle–Targeted Cancer Therapies. **The Annual Review of Cancer Biology**, v.1, n.2, p.1–17, 2017.

SILVA, C. C. **Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK)**. 2016. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas.

SILVA, C. M. B.; ORTEGA FERRUSOLA, C.; MORILLO RODRIGUEZ, A.; et al. Sex sorting increases the permeability of the membrane of stallion spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v. 138, n. 3-4, p. 241-251, 2013.

SILVA, C. S.; GUIM, T. N.; FERNANDES, C. G.; BARBOZA, D. V.; CLEFF, M. B. Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos em cães. **Clínica Veterinária**, v.22, n.126, p.52-60, 2017.

SILVA, E. F.; VARELA-JUNIOR, A. S.; CARDOSO, T. F.; et al. Reproductive toxicology of 2,4 dinitrophenol in boar sperm. **Toxicology in Vitro**, v. 35, p. 31-35, 2016.

SILVA, E. C. B., CAJUEIRO, J. F. P., SILVA, S. V.; SOARES, V. P.; GUERRA, M. M. P. Effect of antioxidants resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. **Theriogenology**, v.77, p.1722-1726, 2012.

SILVA, M. G. F. **Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 2011. 70f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná .

SILVEIRA, S.; VARELA JUNIOR, A. S.; CORCINI, C. D.; DOMINGUES, W. B.; REMIÃO, M.; SANTOS, L.; BARRETO, B.; LESSA, I.; MARTINS, D.; BOYLE, R. T.; COSTA, P. G.; BIANCHINI, A.; ROBALDO, R. B.; CAMPOS, V. F. Roundup® Herbicide Decreases Quality Parameters of Spermatozoa of Silversides *Odontesthes Humensis*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.102, n.1, p.1-6, 2019.

SOLIMAN, A. M.; DESOUKY, S.; MARZOUK, M.; SAYED, A. A. *Origanum majorana* Attenuates Nephrotoxicity of Cisplatin Anticancer Drug through Ameliorating Oxidative Stress. **Nutrients**, v.8, n.264; p.1-9, 2016.

TATMAN, D.; MO, H. Volatile isoprenoid constituents of fruits, vegetables and herbs cumulatively suppress the proliferation of murine B16 melanoma and human HL-60 leukemia cells. **Cancer Letters**, v.175, p.129-139, 2002.

TONSHIN, A. A.; TEPLOVA, V. V.; ANDERSSON, M. A.; SALKINOJA-SALONEN, M. S. The Fusarium mycotoxins enniatins and beauvericin cause mitochondrial dysfunction by affecting the mitochondrial volume regulation, oxidative phosphorylation and ion homeostasis. **Toxicology**, v.276, p.49–57, 2001.

TUROLLA, M.S.R.; Nascimento, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas*, v.42, p.189-306, 2006.

VICENTE-CARRILLO, A.; EDEBERT, I.; GARSIDE, H.; COTGREAVE, I.; RIGLER, R.; LOITTO, V.; MAGNUSSON, K. E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: implications for drug toxicity testing and the 3R principles. **Toxicology In Vitro**, v.29, n.3, p.582-591, 2015.

WALLER, S. B.; CLEFF, M. B.; MATTOS, C. B.; SILVA, C. C.; GIORDANI, C.; LANA, D. F. D.; FUENTEFRIA, A. M.; FREITAG, R. A.; SALLIS, E. S. V.; MELLO, J. R. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. *In vivo* protection of the marjoram (*Origanum*

majorana Linn.) essential oil in the cutaneous sporotrichosis by *Sporothrix brasiliensis*. **Natural Product and Research**, n.17, p.1-5, 2019.

WANG, H.; KHOR, T. N.; SHU, L.; SU, Z-Y.; FUENTES, F.; LEE, J-H.; KONG, A-N. T. Plants vs. Cancer: A Review on Natural Phytochemicals in Preventing and Treating Cancers and Their Druggability. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.12, n.10, p.1281-1305, 2012.

WEYDEN, L.; BRENN, T.; PATTON, E. E.; WOOD, G. A.; ADAMS, D. J. Spontaneously occurring melanoma in animals and their relevance to human melanoma. **The Journal of Pathology**, v.252, n.1, p.4-21, 2020.

WITHROW, S. J.; VAIL, D. M.; PAGE, R. L. Why Worry About Cancer in Companion Animals? In.: WITHROW, S. J.; MacEWEN, E. G. **Small Animal Clinical Oncology**. 5.ed. United States of America: Saunders, 2013.

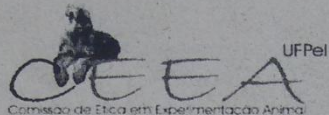
XU, W.; MACARTHUR, G. Cell Cycle Regulation and Melanoma. **Current Oncology Reports**, v.18, n.34, p.1-12, 2016.

ZHAO, K.; SINGH, J. Mechanism(s) of In Vitro Percutaneous Absorption Enhancement of Tamoxifen by Enhancers. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.89, n.6, 2000.

ZUCCARI, D. A. P. C.; JARDIM-PERASSI, B. V.; LOPES, J. R.; COLOMBO, J.; SILVA, C. L. Biologia do Câncer. In: DALECK, C. R.; DE NARDI, A. B. **Oncologia em Cães e Gatos**. 2.ed. Rio de Janeiro: Roca, 2016.

Anexos

Anexo I - Documento da Comissão de Ética e Experimentação Animal



Pelotas, 26 de novembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA)

Para: Profa. Marlete Brum Cleff

Departamento de Clínicas Veterinárias – Faculdade de Veterinária

Senhora Professora:

A CEEA analisou o projeto intitulado: “**Testes com modelos alternativos na avaliação de toxicidade de extratos vegetais**”, processo nº 23110.007044/2015-11, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 7044-2015).

Vigência do Projeto: 26/11/2015 a 06/03/2019

Espécie/Linhagem: *Canis lupus familiaris* e *Coturnix coturnix japônica*

Nº de animais: 01 canino e 325 ovos embrionados

Idade: Adulto (cão) e embriões

Sexo: Machos e fêmeas

Origem: Hospital de Clínicas Veterinárias – UFPeI (cão) e Granja Fujikura, Suzano-SP

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Assinatura do Professor Responsável:

Ciente em 04/12/2015