

## DETERMINAÇÃO DA TOXIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTA DA FAMÍLIA LAMIACEAE EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS SUÍNAS

RAFAEL MIELKE BARBOSA<sup>1</sup>; NATHÁLIA WACHOLZ KNABAH<sup>2</sup>; CRISTINE CIOATO DA SILVA<sup>3</sup>; CLAUDIA GIORDANI<sup>4</sup>; MARLETE BRUM CLEFF<sup>5</sup>; CARINE CORCINI<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – rafaelmielkeb@gmail.com

<sup>2</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – nathaliaknabah@gmail.com

<sup>3</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – criscioato@hotmail.com

<sup>4</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – claarte@hotmail.com

<sup>5</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – marletecleff@gmail.com

<sup>6</sup>Faculdade de Medicina Veterinária – UFPel – corcinicd@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

A utilização de substâncias naturais para fins medicinais é um antigo hábito na sociedade, a qual vem buscando tornar-se independente de fármacos sintéticos (OLIVEIRA, 2006). Dentre essas substâncias, estão presentes as ervas, óleos e extratos da família *Lamiaceae*. Apesar, da eficácia terapêutica dos agentes naturais estar sendo estudada, muitas vezes o uso desses óleos e extratos é dado pelo conhecimento popular (GIORDANI, 2013).

As plantas da família *Lamiaceae* tem indicação de uso como antioxidantes, analgésicas, antimicrobianas, carminativas e antissépticas, entre outras aplicações, de acordo com cada gênero e espécie (TRINDADE, 2016). No entanto, várias espécies de plantas medicinais ainda são utilizadas seguindo a medicina popular, sem que seja estabelecido o seu potencial tóxico (GIORDANI, 2013). Dessa forma, testes que demonstrem a toxicidade de produtos vegetais são essenciais para que se possa viabilizar seu uso medicinal (BLANK, 2013).

Nesse contexto, esse trabalho tem como objetivo analisar a toxicidade de diferentes concentrações do óleo *FITO42* da família *Lamiaceae* em células espermáticas suínas, apontando sua interferência em diferentes características celulares.

### 2. METODOLOGIA

As folhas secas de *FITO42* foram adquiridas de distribuidor comercial (Lote nº: 00814) e a extração dos óleos foi realizada de acordo com as orientações da Farmacopéia Brasileira IV (1988), através de arraste de vapor, em aparelho Clevenger. Após a extração, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro.

Para os testes, foram adicionados 50µL de cada concentração do óleo essencial em 50µL da fração rica de sêmen suíno diluído em BTS (Beltsville Thawing Solution), obtido através do método de coletas em manequim, de três machos diferentes. Foram testadas as concentrações finais de 0,4 e 0,2% do óleo essencial. Para emulsificação dos óleos com o diluente (BTS) foi utilizado o dimetilsulfóxido (DMSO) em uma concentração de 0,5%. O DMSO, quando testado isoladamente, não apresentou toxicidade para as células utilizadas nesse estudo, nessa concentração. As análises microscópicas foram feitas no tempo zero, ou seja, imediatamente após a exposição do sêmen ao óleo essencial e após 24 horas de exposição, sendo as amostras armazenadas sob refrigeração a 17°C durante esse período.

Utilizou-se o sistema computadorizado (CASA) para avaliação da cinética espermática. Para tanto, foram colocados 3  $\mu$ L de sêmen em lâmina própria para a leitura, na qual foram selecionados 6 campos para as análises. A mensuração da cinética espermática foi feita através da avaliação da motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), em porcentagem, amplitude lateral da cabeça (ALH) e da média da distância percorrida (DAP), em micrômetros, e frequência de batimentos (BCF), em Hertz.

A análise estatística dos dados foi realizada com o programa Statistix 9.0, pela metodologia da análise de variância (ANOVA), comparando as médias de cinética espermática pelo teste de Tukey em relação às concentrações utilizadas. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas tabelas 1 e 2, percebe-se que em ambos os momentos a Motilidade Total e Progressiva obtiveram diferenças percentuais significativas, comparando-se o controle, com as amostras tratadas com 0,2% e 0,4% de óleo *Fito42*. A diminuição da motilidade foi dependente da concentração de óleo essencial utilizada, ou seja, quanto maior concentração do óleo, menor a porcentagem de movimentação e viabilidade seminal. O mesmo parâmetro não foi influenciado pelo tempo de exposição. Dessa forma, é possível observar que o óleo de *FITO42* exibiu toxicidade para as células espermáticas.

Tabela 1 – Média ( $\pm$  erro padrão) dos parâmetros de cinética espermática, motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), amplitude lateral da cabeça (ALH), média da distância percorrida (DAP) e frequência de batimentos (BCF), das amostras expostas imediatamente ao *FITO42* ( $n=3$ ).

<i>FITO42</i>	MT (%)	MP (%)	ALH ( $\mu$ m)	BCF (Hz)	DAP ( $\mu$ m)
CN*	72,1 $\pm$ 2,9 <sup>A</sup>	53,2 $\pm$ 3,1 <sup>A</sup>	2,0 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	33,0 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>	22,6 $\pm$ 1,4 <sup>A</sup>
0,4%	8,9 $\pm$ 1,8 <sup>D</sup>	2,6 $\pm$ 0,7 <sup>D</sup>	2,5 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	27,1 $\pm$ 3,7 <sup>AB</sup>	10,4 $\pm$ 1,0 <sup>C</sup>
0,2%	10,9 $\pm$ 2,4 <sup>D</sup>	4,1 $\pm$ 0,9 <sup>D</sup>	2,5 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	23,1 $\pm$ 2,2 <sup>B</sup>	12,1 $\pm$ 0,6 <sup>BC</sup>

\*CN= Controle negativo;

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ )

Tabela 2 – Média ( $\pm$  erro padrão) dos parâmetros de cinética espermática, motilidade total (MT) e motilidade progressiva (MP), amplitude lateral da cabeça (ALH), média da distância percorrida (DAP) e frequência de batimentos (BCF), das amostras após 24 horas da exposição ao *FITO42* ( $n=3$ ).

<i>FITO42</i>	MT (%)	MP (%)	ALH ( $\mu$ m)	BCF (Hz)	DAP ( $\mu$ m)
CN*	78,9 $\pm$ 2,9 <sup>A</sup>	77,8 $\pm$ 3,1 <sup>A</sup>	60,1 $\pm$ 0,2 <sup>AB</sup>	67,3 $\pm$ 0,7 <sup>A</sup>	80,3 $\pm$ 1,4 <sup>A</sup>
0,4%	16,8 $\pm$ 1,8 <sup>C</sup>	15,7 $\pm$ 0,7 <sup>C</sup>	29,8 $\pm$ 0,2 <sup>B</sup>	22,5 $\pm$ 3,7 <sup>B</sup>	18,7 $\pm$ 1,0 <sup>B</sup>
0,2%	27,8 $\pm$ 2,4 <sup>BC</sup>	34,2 $\pm$ 0,9 <sup>BC</sup>	78,3 $\pm$ 0,2 <sup>A</sup>	58,0 $\pm$ 2,2 <sup>A</sup>	48,0 $\pm$ 0,6 <sup>AB</sup>

\*CN= Controle negativo

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ).

Analogamente, observou-se uma redução significativa na Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), principalmente na concentração de 0,4%

em 24 horas. A mensuração desse parâmetro está relacionada com a capacidade de penetração do sêmen na zona pelúcida do óvulo, assim, a ALH é um dos parâmetros que tem efeito sobre a fertilização.

Assim como o ALH, a frequência de batimento flagelar cruzado (BCF) obteve variação estatística principalmente na concentração de 0,4% em 24 horas. Essa análise avalia o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento. Se existem mais batimentos/segundos que imagens/segundos, então, a BCF irá ser subestimada.

Houve uma redução do DAP, conforme demonstrado nas tabelas, de acordo com o aumento das concentrações de óleo na solução. Sabendo-se que o DAP é um parâmetro de avaliação da distância média percorrida pelo espermatozoide, observou-se, portanto, uma distância menor na presença de óleo, logo, uma possibilidade de fertilização menor e sua regressão em tempo mais curto.

Assim, o óleo *Fito42* trouxe malefícios às células espermáticas, as quais ainda estavam hábeis. Com intuito de identificar possíveis locais de ação desses agentes naturais, que afetaram tais características na célula espermática (ALH, BCF, DAP, MT e MP), seriam possíveis estudos mais aprimorados como a citometria.

Ademais, existem poucos estudos com óleos, extratos e agentes naturais, que muitas vezes são utilizados como fitoterápicos, principalmente, por conhecimento popular. Isso pode representar um perigoso hábito, por serem ingeridos constantemente e sem saber concentrações, doses e níveis de toxicidade. Além disso, muitas vezes a atividade terapêutica dos produtos vegetais também é desconhecida, assim como a sua real eficácia.

#### 4. CONCLUSÕES

Pode – se concluir que o óleo *Fito42*, analisado nesse trabalho demonstra toxicidade às células espermáticas suínas nas concentrações de 0,2% e 0,4%, tanto em sêmen fresco, quanto em sêmen resfriado a 17C° durante 24 horas.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

GIORDANI, C. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente à *Malassezia pachydermatis***. 2013. 26f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano**. Agosto de 2002. Dissertação (Mestrado em Química) – Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

OLIVEIRA, M.J.R; SIMÕES, M.J.S; SASSI, C.R.R. **Fitoterapia no sistema de saúde pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

SANTIN, R. **Potencial Antifúngico e Toxicidade de Óleos Essenciais da Família Lamiaceae.** 08 Março de 2013. Dissertação (Doutorado em Ciências Veterinárias) Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

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).** 25/02/2016. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

SIVROPOULOS, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. **Antimicrobial and cytotoxic activities of Origanum essential oils.** Journal of Agricultura ans Food Chemistry. v.44, n.5, p. 1202-1205,1996.

TRINDADE, E.L; GARCIA, F; FERREIRA, R; PASA, M.C. **LAMIACEAE-LEVANTAMENTO DE DADOS DAS PLANTAS MEDICINAIS RECORRENTES NO ESTADO DE MATO GROSSO PRESENTES NO HERBÁRIO UFMT CAMPUS DE CUIABÁ-MT.** Biodiversidade - v.15, n2. p. 183, 2016.