

DETERMINAÇÃO DA TOXIDADE DE ÓLEO ESSENCIAL DE PLANTA DA ESPÉCIE *Origanum majorana* EM CÉLULAS ESPERMÁTICAS OVINAS

RAFAEL MIELKE BARBOSA¹; NATHÁLIA WACHOLZ KNABAH²; CRISTINE CIOATO DA SILVA³; KARINA GUTERRES⁴; MARLETE BRUM CLEFF⁵; CARINE CORCINI⁶

1 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPEL – rafaelmielke@gmail.com

2 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPEL – nathaliaknabah@gmail.com

3 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPEL – criscioato@hotmail.com

4 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPEL – gutierrez.karina@gmail.com

5 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPEL – marletecleff@gmail.com

6 Faculdade de Medicina Veterinária – UFPEL – corcincd@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 os extratos vegetais em diferentes formas como os óleos essenciais da espécie *Origanum majorana*, conhecida popularmente como manjerona, pertencente a família das 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).

Ademais, a utilização de extratos naturais como na criopreservação de sêmen tem sido estudada, com intuito de melhorar a qualidade espermática, no que se refere a antioxidantes, possibilitando assim o manuseio em diferentes métodos de criopreservação e utilização do sêmen com maior qualidade. (CASTILHOS, 2008).

Nesse contexto, esse trabalho tem como objetivo analisar a toxicidade de diferentes concentrações do óleo essencial de *Origanum majorana* em células espermáticas ovinas, apontando sua interferência em diferentes características celulares.

2. METODOLOGIA

As folhas secas de *Origanum majorana* 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.

Foram utilizados sêmen de 5 carneiros das raças Criolo e Corriedale, mantidos na Universidade Federal de Pelotas, através de coleta feita por vagina artificial.

Para os testes, foram adicionados 100µL de cada concentração do óleo essencial, diluído em Tween, em 100µL de sêmen de ovinos diluído em TRIS-Gema (OLIVEIRA ET AL. 2009). O Tween, 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 incubadas por 10

minutos a 37°C, após 24 e 48 horas de exposição, sendo as amostras armazenadas sob refrigeração a 5°C durante esse período.

Para as análises, utilizou-se o sistema computadorizado (CASA) para avaliação da cinética espermática. Para tanto, foram colocados 3 µL 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, 2 e 3 percebe-se que independente do momento obteve-se alteração significativa nas variáveis Motilidade Total (MT) e Motilidade Progressiva (MP). A partir da concentração de 0,4% de óleo de *Origanum majorana* começou ter gradativa toxicidade sobre o espermatozoide de ovinos. A concentração de 0,2% apresentou-se melhor que o Controle Negativo na motilidade total, indicando possível ação antioxidante frente ao espermatozoide ou uma ação de bloqueio das espécies reativas de oxigênio.

Ao que se refere à Amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH), observou-se uma variação estatística significativa, principalmente nas concentrações mais elevadas do óleo, tendo sua discrepância estendida conforme o período de exposição ao *Origanum majorana*. 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 0,8% em todos os momentos, sendo gradativo conforme a concentração e tempo de exposição ao óleo. Essa análise avalia o número de vezes que a cabeça do espermatozoide cruza a direção do movimento.

Analogamente, 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.

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. Entretanto esses agentes naturais são potenciais recursos que podem ser utilizados, tanto para fins medicinais como para auxiliar em outros métodos, assim como a criopreservação de sêmen, porém para isso é necessário abranger maiores estudos sobre os efeitos que os mesmos promovem nas células.

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 óleo de *Origanum majorana* (n=4).

Óleo essencial	MT (%)	MP (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)	DAP (μ m)
CN*	61,5 \pm 2,3 ^{BC}	56,0 \pm 2,5 ^{AB}	2,6 \pm 0,1 ^A	33,9 \pm 0,5 ^A	27,3 \pm 0,6 ^A
0,2%	71,8 \pm 2,4 ^A	64,4 \pm 2,9 ^A	3,0 \pm 0,1 ^A	30,2 \pm 0,3 ^{AB}	26,2 \pm 0,7 ^A
0,4%	56,4 \pm 3,4 ^C	48,7 \pm 3,6 ^C	2,9 \pm 0,1 ^A	28,2 \pm 0,3 ^{BC}	24,8 \pm 0,9 ^A
0,8%	24,1 \pm 3,7 ^D	17,1 \pm 3,0 ^D	1,9 \pm 0,1 ^B	23,3 \pm 1,0 ^C	14,5 \pm 0,8 ^B

*CN= Controle negativo; Letras diferentes na mesma coluna 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 expostas após 24 horas ao óleo de *Origanum majorana* (n=4).

Óleo essencial	MT (%)	MP (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)	DAP (μ m)
CN*	36,0 \pm 2,2 ^{AB}	27,5 \pm 2,1 ^{AB}	3,2 \pm 0,1 ^A	29,5 \pm 0,3 ^A	24,7 \pm 0,9 ^A
0,2%	42,3 \pm 4,4 ^A	33,3 \pm 4,2 ^A	2,8 \pm 0,1 ^{AB}	27,8 \pm 0,4 ^{AB}	20,6 \pm 0,9 ^B
0,4%	33,3 \pm 2,4 ^{AB}	16,4 \pm 2,0 ^C	2,7 \pm 0,1 ^{AB}	25,7 \pm 0,9 ^{AB}	16,2 \pm 0,8 ^C
0,8%	4,9 \pm 0,6 ^C	2,1 \pm 0,3 ^D	2,6 \pm 0,3 ^{AB}	22,0 \pm 2,5 ^B	10,1 \pm 1,0 ^D

*CN= Controle negativo; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey(P<0,05)

Tabela 3 – 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 após 48 horas ao óleo de *Origanum majorana* (n=4).

Óleo essencial	MT (%)	MP (%)	ALH (μ m)	BCF (Hz)	DAP (μ m)
CN*	34,8 \pm 2,4 ^B	27,8 \pm 2,2 ^B	3,2 \pm 0,1 ^A	28,1 \pm 0,4 ^A	26,1 \pm 1,2 ^A
0,2%	46,4 \pm 2,9 ^A	36,7 \pm 2,8 ^A	2,7 \pm 0,1 ^{AB}	27,9 \pm 0,3 ^A	22,3 \pm 1,0 ^{AB}
0,4%	22,3 \pm 2,4 ^C	10,7 \pm 2,2 ^C	2,0 \pm 0,1 ^{BC}	23,8 \pm 1,3 ^A	14,7 \pm 0,9 ^C
0,8%	2,2 \pm 0,3 ^D	0,8 \pm 0,2 ^D	1,5 \pm 0,3 ^{CD}	12,8 \pm 2,8 ^B	6,2 \pm 1,2 ^D

*CN= Controle negativo; Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença estatística pelo teste de Tukey(P<0,05)

4. CONCLUSÕES

Pode – se concluir que o óleo *Origanum majorana*, analisado nesse trabalho demonstra toxicidade às células espermáticas ovinas nas concentrações de 0,4% e 0,8%, tanto em sêmen fresco, quanto em sêmen resfriado a 5C° durante 24 e 48 horas. Porém em concentração de 0,2% não apresentou toxicidade, e ainda indicou possível ação antioxidante, comparado ao grupo controle.

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.

CASTILHOS, E.F. Uso da própolis e do ácido ascórbico na criopreservação do sêmen caprino. 2008. Dissertação (*Magister Scientiae*) – Programa de Pós-Graduação de Medicina Veterinária, universidade Federal de Viçosa.

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 publica (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Plantas Medicinas, 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.

OLIVEIRA, R.V.; et al. Avaliação morfológica de espermatozóides caprinos diluídos e congelados em meio à base de água de coco em pó (ACP-101) ou Tris, corados por eosinanigrosina e azul de bromofenol. Ciência Animal Brasileira, v.10, n.3, p.862-869, 2009.