

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Rosmarinus officinalis* L. EM RATOS WISTAR**

LUCIANA DALAZEN DOS SANTOS

**PORTO ALEGRE**

**2017**

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

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE**  
***Rosmarinus officinalis* L. EM RATOS WISTAR**

**Autora: Luciana Dalazen dos Santos**

**Tese apresentada como requisito parcial  
para obtenção do grau de Doutor em  
Ciências Veterinárias na área de  
Morfologia, Clínica, Cirurgia e  
Reprodução Animal, Especialidade:  
Farmacologia e Terapêutica Animal.**

**Orientador: Prof. Dr. João Roberto  
Braga de Mello**

**PORTO ALEGRE**

**2017**

dos Santos, Luciana Dalazen  
Avaliação da Toxicidade Reprodutiva do Óleo  
Essencial de Rosmarinus officinalis L. em Ratos  
Wistar / Luciana Dalazen dos Santos. -- 2017.  
99 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,  
BR-RS, 2017.

1. Toxicologia. 2. Fertilidade. 3. Alecrim. 4.  
Óleo Essencial. 5. Produtos Naturais. I. de Mello,  
João Roberto Braga, orient. II. Título.

Luciana Dalazen dos Santos

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE REPRODUTIVA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*Rosmarinus officinalis* L. EM RATOS WISTAR

Aprovada em

APROVADA POR

---

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

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Fernanda Bastos de Mello  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Cristina Faccioni Heuser  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Helena Maria Tannhauser Barros  
Membro da Comissão

Dedico esse trabalho ao meu marido, Alex Michels,  
pela dedicação, força, apoio e paciência. Você é especial!

## AGRADECIMENTOS

Em especial, meu agradecimento ao meu professor orientador Dr. João Roberto Braga de Mello, pela paciência, confiança, pelas constantes demonstrações de sabedoria, mostrando-me a nobre função da docência. Sou inteiramente grata por essa orientação que ultrapassa a tese. Obrigada pelo exemplo!

À Fernanda Bastos de Mello que sempre disposta a colaborar, me orientou em todas as fases da pesquisa com muita sabedoria e palavras certas nas horas certas. Muito obrigada pelos diálogos e pelo imenso carinho nos momentos difíceis. Você é referência profissional e pessoal para o meu crescimento. Muito obrigada!

Sou profundamente grata à amiga Andrea Dantas, pela indescritível solidariedade e afeto inestimável, que se traduziram sempre em palavras de conforto e deliciosas conversas. Entusiasmada com a pesquisa, me ensinou muito sobre o experimento me induzindo a pensar criticamente. Muito obrigada pela amizade, colaboração e por me ensinar a importância da paciência!

Meus sinceros agradecimentos a todos que contribuíram para que, mesmo nos períodos de ausência, os experimentos corressem da melhor forma possível, em especial as amigas Clarissa, Laís e Amanda. Jamais esquecerei o quanto se dedicaram. Estarão sempre nas minhas melhores lembranças!

Aos estagiários que contribuíram com seriedade, respeito, sabedoria e amizade: Priscila, Rafaela, Rafael, Isabela, Bruna, Carolina, Marília, Pâmela, Mariana, Fabiane, Luisa, Jaqueline, Elisa e Marcella. Muito obrigada, vocês são especiais!

Aos laboratórios colaboradores nesse trabalho: Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos, UFRGS (Luiz Carlos Klein-Júnior, Prof. Amélia Henriques), Setor de Patologia Veterinária, UFRGS (Marina Paula Lorenzetti, Prof. David Driemeier). Muito obrigada!

Aos professores e colaboradores do PPGCV e do Departamento de Farmacologia, pela dedicação, competência e especial atenção. Muito obrigada!

À minha amiga Vanessa, que não imagina a importância que teve durante esta fase, trazendo alegria e leveza aos meus dias em Porto Alegre. Muito obrigada!!

## RESUMO

O alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma planta comum de jardim, estudada por suas diversas atividades biológicas. O óleo essencial de alecrim (OEA) é composto por substâncias químicas que interagem entre si e com o organismo de forma complexa, portanto, para que possa ser utilizado pela indústria farmacêutica é necessário avaliar minuciosamente a sua segurança. Os testes de toxicidade reprodutiva são recomendados pela ANVISA, OECD e FDA como parâmetros a serem avaliados em relação aos efeitos de desenvolvimento reprodutivo. Tendo em vista a importância de estabelecer segurança ao usar esta planta, este estudo investigou a toxicidade reprodutiva do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e seu composto majoritário (1,8 cineol) em ratos Wistar, avaliando machos e fêmeas adultos, efeitos sobre o desenvolvimento fetal e parâmetros comportamentais da prole. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: CN (controle negativo – Tween 80), C3 (OEA 300 mg.kg<sup>-1</sup>), C6 (OEA 600 mg.kg<sup>-1</sup>), C12 (OEA 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e CE (1,8 cineol 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>). Os machos foram tratados antes (70 dias) e durante o acasalamento (21 dias) e as fêmeas antes (14 dias) e durante o acasalamento (21 dias), gestação (21 dias) e lactação (21 dias). Para o estudo dos efeitos teratogênicos sobre as ninhadas, somente fêmeas foram tratadas do 6º ao 15º dia de gestação. Para identificar alterações no sistema reprodutivo dos machos e das fêmeas foram avaliados: consumo relativo de água e ração, peso relativo de órgãos, histopatologia, taxas reprodutivas e sinais de toxicidade; além disso, para os machos ainda foram estudados número e morfologia dos espermatozoides. Na prole, foram avaliados: comportamento e sinais de toxicidade materna, parâmetros reprodutivos e comportamentos em campo aberto e sexual. E para o potencial teratogênico, os fetos passaram pelo processo de diafanização, coloração e em seguida avaliados individualmente para a presença de alterações esqueléticas. O composto majoritário identificado e quantificado no óleo foi 1,8-cineol (44,85 %). Na avaliação dos efeitos reprodutivos de machos e fêmeas adultos, as fêmeas do grupo CE apresentaram redução no número de fetos por ninhada (8,3) e aumento da massa corporal (7,1g) dos mesmos, sugerindo embriofetividade. Os animais não apresentaram sinais de toxicidade sistêmica. Para a prole avaliada, houve aumento da testosterona sérica (7,98 ng/mL) e do número de espermatozoides (624,37 x 10<sup>6</sup>) para o grupo CE. No PPD 2 os animais dos grupos C6 (27,8s) e C12 (28,73s) levaram mais tempo para concluir o reflexo de endireitamento em superfície, o que também ocorreu para os animais do grupo C6 (12,27s) no PPD4. Os animais do grupo C6 (19,45s) e C12 (20,70s) também tiveram aumento do tempo no reflexo de geotaxia no PPD2. O grupo C3 demonstrou maior comportamento exploratório no teste de campo aberto, com aumento da frequência de entrada no centro (14,73) e diminuição de *grooming* (0,54) quando comparados ao grupo controle. Não foram observados sinais de toxicidade materna. Na avaliação dos fetos expostos durante o período de organogênese, houve uma tendência para o aumento das perdas pós-implantação, quanto maior a dose testada, para os grupos que receberam OEA. Os tratamentos interferiram no desenvolvimento fetal demonstrado pelo retardo no desenvolvimento esquelético em todos os grupos, sugerindo que a exposição à estas doses do óleo essencial e 1,8 cineol devem ser evitadas em gestantes. Os grupos C6, C12 e CE apresentaram maior proporção de fetos com anormalidades no esqueleto (78,31%, 100% e 95,06%, respectivamente).

**Palavras chave:** Toxicologia. Fertilidade. Desenvolvimento Fetal. Teratogenia. Produtos Naturais. Alecrim. *Rosmarinus officinalis*. Óleo essencial.

## ABSTRACT

*The Rosemary (Rosmarinus officinalis L.) is an ordinary plant from the yard studied for its several biological activities. The Rosemary essential oil (REO) is composed by chemical substances which interact with each other and with the organism of complex form, therefore, it's necessary to evaluate its safety deeply for making its usage possible for the industry. The reproductive toxicity tests are recommended by ANVISA, OECD and FDA as parameters to be evaluated regarding the effects of reproductive development. Aiming at the importance of establishing confidence on this plant usage, the present study investigated the reproductive toxicity of the Rosmarinus officinalis essential oil and its majority component (1,8 cineol) in Wistar rats considering male and female adults, effects on the fetal development and behavior parameters of the offspring. The animals were divided into five experimental groups: NC (negative control - Tween 80), C3 (REO 300 mg.kg<sup>-1</sup>), C6 (REO 600 mg.kg<sup>-1</sup>), C12 (REO 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e CE (1,8 cineol 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>). The male samples were fed before (70 days) and during the mating (21 days) and the female ones were fed before (14 days) and during the mating (21 days), pregnancy (21 days) and lactation (21 days). For studying teratogenic effects on the offspring, just female samples were fed from the sixth to the fifteenth day of pregnancy. In order to identify modifications on the reproductive system of male and female samples it was analyzed: relative water and feed consumption, relative weight of organs, histopathology, reproductive taxes and toxicity signs; besides, for the male ones, number and morphology of sperm were also studied. About the offspring, maternal behavior and signs of toxicity, reproductive parameters and open and sexual field were studied. For the teratogenic potential, the offspring were submitted to a diaphanous process, coloring and next were evaluated separately for checking the existence of skeletal changes. The majority component identified and qualified into the oil was 1,8-cineol (44,85 %). In evaluating the reproductive effects of adults males and females, the females of the CE group presented a reduction in the number of fetuses per litter (8,3) and increased body mass (7,1g), suggesting embryolethality. The animals showed no signs of systemic toxicity. For the evaluated offspring, there was an increase in serum testosterone (7,98 ng / mL) and the number of spermatozoa (624.37 x 106) for the CE group. In PPD 2 the animals of groups C6 (27,8s) and C12 (28,73s) took longer to complete the surface righting reflex, which also occurred for the animals of the C6 group (12,27s) in PPD4. The animals of group C6 (19,45s) and C12 (20,70s) also had increased time in the geotaxia reflex in PPD2. The C3 group showed higher exploratory behavior in the open field test, with an increase in the entrance frequency in the center (14,73) and a decrease in grooming (0,54), when compared to the control group. No signs of maternal toxicity were observed. In the evaluation of the fetuses exposed during the period of organogenesis, there was a tendency for the increase in the post-implantation losses, the larger the dose tested, for the groups that received REO. Treatments interfered in fetal development demonstrated by delayed skeletal development in all groups, suggesting that exposure to these doses of essential oil and 1,8-cineol should be avoided in pregnant women. Groups C6, C12 and CE presented a higher proportion of fetuses with skeletal abnormalities (78,31%, 100% and 95,06%, respectively).*

**Key words:** Toxicology. Fertility. Fetal Development. Teratogeny. Natural Products. Rosemary. Rosmarinus officinalis. Essential oil.



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1. *Rosmarinus officinalis* L. .... 18
- Figura 2. Estrutura química do 1,8 cineol (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O)..... 20
- Figura 3. Períodos de desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato.. 31

### ARTIGO 1

- Figura 1. Evolução da massa corporal (g) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante gestação e lactação..... 42
- Figura 2. Característica de desenvolvimento comportamental (Endireitamento em Superfície) (segundos) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) nos dias pós-natal 2, 3, 4 e 5..... 43
- Figura 3. Característica de desenvolvimento comportamental (Geotaxia Negativa) (segundos) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) nos dias pós-natal 7, 8, 9 e 10..... 44
- Figura 4. Característica de desenvolvimento comportamental (Resposta de Agarrar) (segundos) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) nos dias pós-natal 14, 15, 16 e 17..... 44

### ARTIGO 2

- Figura 1. Desenho experimental. Os machos (A) foram tratados 70 dias antes e 21 dias durante o acasalamento e ao final deste período, foram eutanasiados. As fêmeas (B) foram tratadas 14 dias antes do acasalamento, 21 dias durante o acasalamento, gestação e lactação e eutanasiadas ao final desse período..... 61
- Figura 2. Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração (A) e água (B) de machos tratados com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o período de pré-acasalamento..... 65

Figura 3. Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o pré-acasalamento (**A**) e gestação (**B**)..... 66

Figura 4. Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de fêmeas tratadas com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o período pré-acasalamento (**A**) e gestação (**B**)..... 67

## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO 1

Tabela 1.	Composição química majoritária do óleo essencial comercial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	41
Tabela 2.	Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral e sexual da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante gestação e lactação.....	42-43
Tabela 3.	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	45
Tabela 4.	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	45-46
Tabela 5.	Índices de fertilidade dos machos púberes expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	46
Tabela 6.	Comportamento em campo aberto de machos expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	47
Tabela 7.	Parâmetros do comportamento sexual de machos expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	47-48

### ARTIGO 2

Tabela 1.	Composição química majoritária do óleo essencial comercial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	64
-----------	--	----

Tabela 2.	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de machos tratados com Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	68
Tabela 3.	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de fêmeas tratadas com Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	68
Tabela 4.	Parâmetros reprodutivos dos machos tratados com Tween 80, 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE).....	69
Tabela 5.	Desempenho reprodutivo de animais tratados com Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o pré-acasalamento e acasalamento.....	69-70

### ARTIGO 3

Tabela 1.	Composição química majoritária do óleo essencial comercial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	83
Tabela 2.	Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de fêmeas expostas a Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) do 6° ao 15° dia de gestação.....	84
Tabela 3.	Índices reprodutivos das progenitoras expostas a Tween 80 (CN), 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) do 6° ao 15° dia de gestação.....	84
Tabela 4.	Percentual de alterações esqueléticas em fetos de fêmeas tratadas com 300 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg <sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg <sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) do 6° ao 15° dia de gestação.....	85

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	17
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	17
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	17
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	18
<b>3.1</b>	<b>Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i> L.)</b> .....	18
3.1.1	Caracterização Botânica.....	18
3.1.2	Composição química do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	19
3.1.3	Usos do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	21
3.1.4	Toxicidade do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> L. ....	24
<b>3.2</b>	<b>Avaliação Toxicológica</b> .....	28
3.2.1	Testes sobre toxicidade reprodutiva.....	29
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA E RESULTADOS</b> .....	32
	ARTIGO I. Efeitos da exposição fetal e lactacional ao óleo essencial de alecrim e 1,8 cineol no desenvolvimento e reprodução na prole de ratos .....	33
	ARTIGO II. Avaliação dos efeitos do óleo essencial de <i>rosmarinus officinalis</i> e 1,8 cineol na reprodução usando testes de fertilidade em ratos wistar. ....	58
	ARTIGO III. Avaliação dos efeitos do óleo essencial de <i>rosmarinus officinalis</i> (alecrim) e seu composto majoritário (1,8 cineol) sobre a fertilidade de ratas e morfologia óssea dos fetos .....	78
<b>5</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	92
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	93
	<b>ANEXO A</b> .....	99

## CAPÍTULO I

### 1 INTRODUÇÃO

Há registros, datados de seis mil anos, da utilização dos óleos essenciais pelos egípcios como curativos e para o bem estar físico através dos aromas obtidos de partes específicas de certos vegetais. No entanto, somente a partir da idade média é que iniciaram os processos de destilação, e a real comercialização de materiais aromáticos (SIANI et al., 2000). As plantas são muito úteis na pesquisa farmacêutica para a síntese e produção de drogas, aumentando as opções terapêuticas tanto para o tratamento quanto para terapia complementar (DANTAS, 2016).

Os óleos essenciais são substâncias naturais de variável poder aromatizante que fazem parte do organismo de diversas espécies vegetais das quais são extraídos segundo processamento específico (OOTANI et al., 2013). Estão incorporados em várias funções essenciais para a manutenção da vida da planta em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra micro-organismos e predadores e também na atração de insetos e outros agentes fecundadores (SIANI et al., 2000).

O Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), planta pequena da família Lamiaceae (LORENZI e MATOS, 2008) e que apresenta propriedades funcionais relacionadas ao seu óleo essencial, especialmente composto por diterpenos amargos, ácido cafeico, flavonoides e triterpenoides (SIMÕES e SPITZER, 2003) vêm sendo alvo de estudos químicos e de potenciais terapêuticos desenvolvidos em cooperação com grupos de pesquisa da UFPel (Universidade Federal de Pelotas – Microbiologia da Faculdade de Veterinária e Instituto de Química), tendo em vista as possibilidades terapêuticas promissoras que apresenta no momento, principalmente quanto a atividade antimicrobiana (FERREIRA et al., 2013; PACKER e LUZ, 2007; HUSSAIN et al., 2010; OKOH et al., 2010; CASTRO e LIMA, 2011; CLEFF et al., 2012)

Devido aos óleos essenciais serem produtos de extração de uma espécie vegetal, são mais concentrados e, portanto, tendem a apresentar toxicidade mais elevada que a planta original (SIMÕES et al., 2000). Faz-se assim necessária, a realização de estudos toxicológicos para garantir a segurança na sua utilização. Apesar do crescente interesse em utilizá-los com finalidade terapêutica, ainda são poucos os estudos que disponibilizam informações referentes à toxicidade que podem desencadear. Neste

contexto, grande parte dos fitoterápicos atualmente utilizados não têm o seu perfil tóxico bem conhecido (VEIGA JUNIOR, 2008).

A toxicologia pré-clínica, etapa que inclui os ensaios toxicológicos previstos nesse projeto, deve avaliar parâmetros de segurança e eficácia de compostos candidatos à fármacos, observando os mesmos princípios científicos e resultados complementares. Dessa forma, os objetivos da etapa pré-clínica são determinar experimentalmente efeitos comportamentais, toxicológicos e farmacológicos de substâncias (LAPA et al., 2000).

A importância da avaliação toxicológica já é relatada em algumas substâncias presentes em plantas conhecidas popularmente, e que apresentam efeitos tóxicos, como o cravo (HENRIQUES et al., 2009). A ANVISA limita o uso de eugenol, presente no cravo, pelo fato de existirem evidências de carcinogenicidade em humanos e animais (HENRIQUES et al., 2009). O confrei (*Symphytum officinale* L. Boraginaceae) possui atividades nefro e hepatotóxicas (SIMÕES e SPITZER, 2003). A cânfora é uma cetona terpenoide, facilmente encontrada em formulações farmacêuticas e quando utilizada em crianças menores de dois anos pode causar irritação na pele, eczema, vertigem, vômito, convulsão e insuficiência respiratória. Esta substância apresenta risco ainda maior quando a criança ingere acidentalmente o produto e/ou ocorre o contato por via nasal, onde a sua absorção é aumentada (HENRIQUES et al. 2009).

Os testes de avaliação da toxicidade reprodutiva geralmente compreendem a exposição de animais sexualmente maduros antes da concepção (Toxicidade Crônica), durante o desenvolvimento pré-natal e após o nascimento, continuamente até sua maturação sexual (Toxicidade Peri e Pós-natal) (LEMONICA, 2001). Os estudos mais utilizados para estas avaliações são divididos em três segmentos: Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” para avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento; Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade” no qual ocorre a exposição da progênie durante a fase de organogênese; e Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” onde são avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento antes e após o nascimento das progênies expostas durante a fase de desenvolvimento fetal e lactacional. Estes testes são adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA, 1996) e recomendadas pela Food and Drugs Administration (FDA) e Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

Os estudos pré-clínicos em modelos animais, apontam substâncias que apresentam capacidade de alterar aspectos fisiológicos como reprodução, fertilidade dos

mamíferos e comportamento da prole. A exposição de ratos Wistar ao óleo essencial do alecrim, que será realizada nesse estudo, visa analisar efeitos significativos no desenvolvimento (fetal e pós-natal), reprodução e comportamento dos animais, de forma a caracterizar o aspecto toxicológico deste óleo. A realização desses ensaios de avaliação toxicológica é de extrema importância para atestar que os compostos químicos presentes na planta em estudo não exercem atividades tóxicas que inviabilizem seu uso com fins terapêuticos.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Contribuir com conhecimentos sobre a utilização do óleo essencial do Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) especialmente no que se refere à toxicidade reprodutiva de forma a indicar o grau de segurança deste óleo como agente terapêutico.

### 2.2 Objetivos Específicos

Avaliar os efeitos do óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre a fertilidade de ratos Wistar, machos e fêmeas, formação e maturação espermática, acasalamento e fertilização, desenvolvimento pré-natal, parto e desenvolvimento pós-natal, com machos tratados antes e durante o acasalamento e fêmeas antes e durante o acasalamento, na gestação e lactação (Segmento I).

Avaliar os efeitos do óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre as possíveis alterações no desenvolvimento da progênie exposta durante a fase de organogênese e a possibilidade de produzir efeitos teratogênicos (Segmento II).

Avaliar os efeitos do óleo essencial de Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o desenvolvimento da progênie exposta durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação (Segmento III).

## CAPÍTULO II

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.)

##### 3.1.1 Caracterização Botânica

O Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) (Figura 1) é uma planta pequena, da família Lamiaceae, de porte subarbustivo lenhoso, de até 1,5 m de altura. Possui folhas pequenas, lineares, coriáceas, opostas, lanceoladas e muito aromáticas, as flores são azulado-claras, pequenas e de aroma forte e agradável. Nativa da região Mediterrânea é cultivada em quase todos os países de clima temperado (LORENZI e MATOS, 2008). No Brasil, sua produção se localiza, principalmente, na região sul do país (CARVALHO, 2004). A sinonímia encontrada na literatura para alecrim é alecrim de horta, alecrim de jardim, erva-coada, erva-de-graça, rosmaninho e rosmarino (LORENZI e MATOS, 2008).



**Figura 2.** *Rosmarinus officinalis* L. Fonte: Ulbricht et al. (2010)

É uma especiaria conhecida desde a antiguidade por seus efeitos medicinais e foi uma das primeiras espécies da família a ser identificada e classificada (AFONSO et al., 2008).

### 3.1.2 Composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Da composição química do alecrim, faz parte o óleo essencial (10 a 25 ml.kg<sup>-1</sup> de folha desidratada), cujos constituintes principais são o alcanfor, 1-8 cineol,  $\alpha$ -pineno, borneol e canfeno em proporções que variam na dependência de sua origem e estado vegetativo (SILVA, 2012).

Os principais compostos ativos do alecrim incluem o ácido carnósico, o ácido rosmarínico, ácido ursólico, o ácido cafeico e carnosol. Cerca de 90% da atividade antioxidante desta planta é atribuída ao carnosol e ao ácido carnósico (WANG et al., 2012).

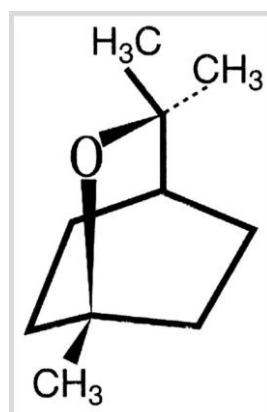
A maioria das suas propriedades funcionais estão associadas à constituição deste por compostos fenólicos, tais como o ácido carnósico e o ácido rosmarínico. Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em vários órgãos da planta e são assim denominados devido à composição lipofílica que apresentam (SIANI et al., 2000), é o produto principal derivado desta planta e amplamente utilizado como tempero para alimentos, perfumes ou produtos cosméticos (devido ao seu aroma próprio) e por sua atividade antimicrobiana (LIU et al., 2011).

Os óleos essenciais produzidos pelo alecrim são uma mistura complexa de compostos, oriundos do seu metabolismo secundário. A análise fitoquímica registrou para suas folhas a presença de óleo essencial constituído de uma mistura de componentes voláteis e não voláteis. Os primeiros, responsáveis pelo seu odor típico, apresentam como principais representantes o cineol, alfa-pineno e cânfora e, entre os compostos não voláteis, os primordiais são o ácido cafeico, diterpenos amargos, flavonoides e triterpenoides (SIMÕES e SPITZER, 2003).

Cleff et al. (2012) avaliaram a composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* coletado na cidade de Pelotas – RS. O mesmo foi obtido das partes aéreas da planta através da hidrodestilação, sendo analisado por cromatografia gasosa com detectores de ionização em chama (GC/FID) e espectrometria de massas (GC/MS). A análise cromatográfica do óleo permitiu identificar como principais compostos cânfora, verbenona e 1,8-cineol.

O 1,8 cineol é relatado por alguns autores como o composto majoritário do óleo essencial de alecrim (OKOH et al., 2010;WALLER et al., 2016), ele é um monoterpeneo

saturado (Figura 2), também conhecido como eucaliptol (JUERGENS, 2014). Recentemente, os estudos se concentram com importante relevância nos efeitos do 1,8 cineol, no sistema nervoso central com ação neuroprotetora (MANNELLI et al., 2016) ansiolítica e antidepressiva (SASAKI et al., 2013; FERLEMI et al., 2015). A fração do 1,8 cineol no *Rosmarinus officinalis* pode variar entre 12 e 47% (VICENZI et al., 2002).



**Figura 2.** Estrutura química do 1,8 cineol (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O). Fonte: Juergens, 2014.

Os óleos essenciais podem ser obtidos utilizando muitos métodos, tais como a destilação a vapor, hidrodestilação, extração por solvente orgânico, assistida por radiação micro-ondas, hidrodifusão e gravidade por micro-ondas, extração de solvente de alta pressão, extração com CO<sub>2</sub> supercrítico, com ultrassons e a extração por micro-ondas sem solventes. No entanto, as propriedades dos óleos extraídos por estes métodos podem variar na dependência do método utilizado (OKOH et al., 2010).

A composição das frações voláteis obtidas do óleo de *R. officinalis*, através de análise por cromatografia gasosa com espectrômetro de massa revelaram a presença de um total de 29 componentes. Em estudo comparando dois métodos de extração (hidrodestilação e extração com micro-ondas sem solventes) foram identificados, no óleo hidrodestilado, 24 compostos que representaram 90,2% do total da composição do óleo, apresentando domínio na presença de monoterpenos como alfa-pineno, canfeno, 1,8 cineol, cânfora, borneol, acetato bornilo e verbenona. Já pelo método de extração com micro-ondas sem solventes foram identificados 21 compostos, totalizando 92,3% do total da composição, também com predomínio de monoterpenos (OKOH et al., 2010).

O óleo essencial de alecrim é geralmente isolado por hidrodestilação tradicional, destilação a vapor e extração com solvente orgânico (LIU et al., 2011).

Muitos estudos demonstram a variabilidade do alecrim em termos de composição, rendimento e atividades antimicrobiana e antioxidante que foram correlacionadas com fatores intrínsecos (genética, idade da planta e subespécies) ou fatores extrínsecos, como efeitos climáticos (GACHKAR et al., 2007, MEZIANE-ASSAMI et al., 2013) e de cultivo (origem geográfica), métodos de identificação e quantificação bem como do método de extração e das técnicas analíticas utilizadas para identificação (DOOLAEGE et al., 2007).

### 3.1.3 Usos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

O uso medicinal do alecrim é referido na literatura etnofarmacológica, que cita o emprego de suas folhas na medicina tradicional de vários países na forma de infusão, nos casos de má digestão, gases no aparelho digestivo, dor de cabeça, dismenorreia, fraqueza e memória fraca. As folhas, flores e frutos secos formam uma excelente mistura para uso na culinária (LORENZI e MATOS, 2008). O estudo das informações sobre esta planta permitiu selecionar como indicação aceita internacionalmente, no tratamento de hipertensão, problemas digestivos, perda do apetite e, externamente nos sintomas de reumatismo (SOUSA et al., 1991; GRUENWALD et al., 2000; SILVA JR, 2003).

Ensaio farmacológicos comprovam suas propriedades espasmolítica sobre a vesícula e o duodeno, colerética, protetora hepática e antitumoral (SOUSA et al., 1991; GRUENWALD et al., 2000).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais são de grande interesse na indústria alimentar, cosmética e farmacêutica. Desde que se admitiu ser possível utilizar aditivos naturais, é crescente o interesse na substituição de conservantes sintéticos pelos naturais (OKOH et al., 2010).

Irkin et al. (2011) comprovaram a atividade antimicrobiana do alecrim para *Arcobacter butzleri* de carne de frango e bovina, e ainda ressaltam que a capacidade antioxidante de extratos ou óleos desta planta melhoram a qualidade organoléptica de produtos derivados de carne. Os mesmos autores, pelos resultados obtidos, aprovam a utilização do óleo essencial como antimicrobiano para alimentos frequentemente contaminados com *Arcobacter*, como carne cozida picada.

A atividade antimicrobiana do *R. officinalis* pode variar, principalmente em decorrência do método utilizado para a extração do mesmo. O óleo obtido de extração por micro-ondas sem solventes foi mais efetivo como antimicrobiano do que o obtido por hidrodestilação, isto se deve, em parte, porque o óleo extraído do forno micro-ondas continha maior quantidade de compostos oxigenados e estes possuem acentuada atividade antibacteriana e antifúngica (OKOH et al., 2010).

Hussain et al. (2010) investigando o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* nativo do Paquistão, afirmaram que o óleo que continha 1,8-cineol (38,5%) e cânfora (17,1%) apresentou atividade (*in vitro*) antioxidante, antiproliferativa e antibacteriana.

O óleo essencial obtido do alecrim mostrou-se inibidor do crescimento tanto de bactérias gram-positivas quanto de gram-negativas. No entanto, melhor resultado foi obtido sobre as primeiras, e pode ser explicado pelas diferenças nas membranas celulares destes micro-organismos. Gram-negativas apresentam membranas altamente hidrofóbicas, ao passo que a afinidade por lipídeos do ácido lipoteicoico da membrana celular de gram-positivas, pode facilitar a penetração de compostos hidrofóbicos (OKOH et al., 2010). O mesmo, também demonstrou atividade bacteriostática e fungistática mais satisfatória quando comparado aos óleos de copaíba, malaleuca, alho e andiroba para cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans* (PACKER e LUZ, 2007).

A avaliação *in vitro* do extrato de alecrim frente a micro-organismos da cavidade oral sugerindo a possibilidade de uso deste extrato como antimicrobiano oral, demonstrou que são necessários novos modelos de estudo que possam reproduzir situações mais próximas àquelas encontradas na cavidade oral para melhor avaliação de agentes antimicrobianos no tratamento e prevenção de infecções orais biofilme-dependentes (SILVA et al., 2008).

Ainda sobre a cavidade oral, o extrato foliar de *R. officinalis* L. apresentou eficácia antibacteriana semelhante à do hipoclorito de sódio a 2,5%, mas foi inferior à clorexidina 2% na desinfecção de cones de utilizados na obturação de canais radiculares contaminados com *Enterococcus faecalis* (JÚNIOR, 2009).

A atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (Alecrim) sobre cepas de *Candida albicans* e *C. tropicalis*, envolvidas com infecções superficiais da cavidade oral foi estudada por Castro e Lima (2011). Para tanto, estes autores utilizaram cepas de *Candida* de origem clínica e de referência para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), utilizando a técnica da

microdiluição. Observou-se discreta atividade antifúngica do óleo de alecrim, com CIM de 5 mg.mL<sup>-1</sup> em 81% das cepas avaliadas. A partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que o óleo essencial *R. officinalis* L. apresentou fraca atividade sobre cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* envolvidas em infecções da cavidade oral.

No entanto, quando testado em isolados de *C. albicans* (cepas padrões e espécie não-albicans) proveniente de candidíase animal pelo método de microdiluição em caldo, o óleo essencial de alecrim demonstrou atividade fungicida e fungistática (CLEFF et al., 2012).

Segundo Santin (2013), o óleo essencial de *R. officinalis* possui atividade antifúngica *in vitro* frente a leveduras isoladas de animais. Os estudos foram realizados com onze isolados de *Malassezia pachydermatis* provenientes de casos clínicos de otites em cães, quatro isolados de *Candida spp.* (dois de *C. albicans*, um de *C. famata* e um de *C. parapsilosis*) e *Trichospon asahii* (n=7) provenientes da cavidade oral de cães hígidos. Frente a estas leveduras, o óleo essencial de alecrim apresentou valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CFM (Concentração Fungicida Mínima) que variaram de ≤ 3,52 a 112,8 mg.mL<sup>-1</sup>. Os melhores resultados foram obtidos contra os isolados de *M. pachydermatis* e destaca-se a baixa atividade inibitória do óleo contra *C. albicans*.

Estudo realizado por Amin e Hamza (2005) avaliou o efeito hepatoprotetor de extratos vegetais, *Hibiscus sabdariffa*, *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis* frente à ação hepatotóxica induzida pela azatioprina em ratos. A investigação demonstrou que todas as plantas testadas restauraram os níveis de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) ao normal e podem ser consideradas agentes protetores de toxicidade da azatioprina. Os animais que receberam somente os extratos testados não apresentaram nenhum sinal de hepatotoxicidade. Estes efeitos podem ser atribuídos à presença de altos percentuais de compostos antioxidantes no extrato aquoso de *R. officinalis* já que foi demonstrado que o extrato de alecrim e os seus compostos antioxidantes inibem peroxidação de lipídios e radicais livres *in vitro* (HARAGUCHI et al., 1995) e *in vivo* (FAHIM et al., 1999).

### 3.1.4 Toxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L.

Estabelecer o perfil toxicológico dos óleos essenciais é um grande desafio. Eles são compostos por um grande número de moléculas altamente funcionais e, portanto, há riscos de sensibilização, irritação, fototoxicidade e efeitos abortivos (DWECK, 2009). Segundo o mesmo autor, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* é responsável por alterações na gestação e sobre o sistema reprodutor, não devendo ser utilizado por via oral, retal ou vaginal durante o período gestacional.

É difícil também, definir a exata metabolização dos óleos essenciais, pois cada componente do óleo pode seguir uma via distinta. Alguns componentes podem ser metabolizados na pele, porém, a grande maioria das alterações metabólicas ocorre no fígado. A via de administração também é um ponto importante a ser considerado nas intoxicações por óleos essenciais, já se sabe que a via dérmica, por exemplo, causa intoxicação em frequência muito menor quando comparada à via oral. Eles demoram geralmente entre um e cinco dias para ser eliminados, porém, alguns compostos podem se acumular e levar mais tempo, especialmente se a exposição ocorre pela via oral diária (TISSERAND, 1996).

Alguns extratos do alecrim foram estudados e foi possível observar que o principal órgão requerido para a biotransformação destes é o fígado (AGUILAR et al., 2008).

O óleo essencial de alecrim obtido por extração com dióxido de carbono supercrítico foi testado em um estudo de toxicidade onde ratas fêmeas receberam por via oral, durante 91 dias a dose de  $2400 \text{ mg.kg}^{-1}$  na dieta (equivalente a aproximadamente  $195 \text{ mg.kg}^{-1}$  de massa corporal por dia), seguido por um período de 28 dias sem tratamento. Passados os 91 dias, constatou-se aumento do peso do fígado, quando comparado ao grupo controle, porém, nenhuma alteração macro ou microscópica foram observadas. Amostras do órgão foram colhidas para mensuração de enzimas microssomais hepáticas, que demonstraram um leve aumento em algumas enzimas e um aumento de 1,5 vezes no citocromo P450 total, estas alterações, no entanto, exibiram caráter reversível com a supressão do tratamento, assegurando se tratarem de alterações adaptativas e não hepatotoxicidade (AGUILAR et al., 2008).

Estudos de toxicidade de 90 dias de tratamento com diferentes extratos de alecrim testados revelam valores de NOAEL (*No Observed Adverse Effect Level*) que variaram de 180-400 mg de extrato/kg de massa corporal/dia (AGUILAR et al., 2008).



Em estudo de toxicidade aguda, onde ratos foram divididos em grupos e cada grupo recebeu uma dose distinta (3500, 4500, 5500, 7500 e 8500 mg.kg<sup>-1</sup> de massa corporal) de ácido carnósico, um composto fenólico do alecrim, os animais foram observados de 3 a 6 horas após a administração, duas vezes por dia, durante 14 dias, e o exame histopatológico foi realizado no 15º dia de tratamento para os animais que sobreviveram. A DL<sub>50</sub> foi de 7100 mg.kg<sup>-1</sup> de massa corporal. Alterações histopatológicas foram observadas no coração e fígado de todos os ratos tratados, uma pequena hidropsia, degeneração citoplasmática e um único ponto de necrose foram observados no fígado, já no coração, observou-se infiltração de células inflamatórias e fibrose do miocárdio (WANG et al., 2012).

Wang et al. (2012) ao estudarem a toxicidade crônica do ácido carnósico por trinta dias em ratos nas doses de 0 (controle), 150, 300 e 600 mg/kg/dia não constataram óbito durante o estudo. A dose maior pode resultar em lesão no fígado e muscular no miocárdio, especialmente para ratos machos. Os autores sugerem que o ácido carnósico apresenta um perfil de toxicidade oral relativamente baixo quando administrado por 30 dias, porém, são necessários novos estudos para estabelecer toxicidade subcrônica.

Em um estudo *in vivo* de toxicidade dérmica aguda do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, os autores concluíram que o óleo essencial de alecrim a 24% causou irritação aguda leve à moderada. Seis coelhos albinos Nova Zelândia que foram avaliados quanto a eritema e edema, os coelhos foram divididos em loção de alecrim 24% (n=3) e loção veículo (n=3), aplicou-se 0,5 mL das substâncias em uma área no flanco direito coberta com gaze e esparadrapo hipoalergênico poroso por 4h. Imediatamente, e 1h após a retirada do curativo todos os animais apresentavam escores 0 para eritema e edema, nas 24h um animal com escore 2 para eritema persistiu até às 72h. Em outro animal observou-se escore 2 na avaliação 48 e 72h e escore 1 para edema nas 72h. Porém, em um animal apenas escore 1 para eritema nas 48h, com remissão total nas 72h (SANTIN et al., 2012).

Além de irritações na pele, a essência do alecrim causa alterações no sono e a ingestão de doses elevadas provoca irritações gastrintestinais e nefrite, podendo causar hipersensibilidade (CARDOSO et al., 2000).

Faria (2005) avaliou o alecrim quanto aos aspectos tóxicos e de letalidade em camundongos. Este se mostrou seguro, sendo que a dose mais elevada, de 5000 mg.kg<sup>-1</sup> não levou os animais a óbito, não sendo possível a determinação da DL<sub>50</sub> neste estudo.

Silva et al. (2007) verificaram o efeito citotóxico de diferentes extratos aquosos obtidos por trituração, infusão e decocção de alecrim (*R. officinalis*), sobre sementes de alface (*Lactuca sativa* L.), através da análise do índice mitótico. Os resultados demonstraram que o alecrim em suas diferentes concentrações é potencialmente genotóxico, sendo que os extratos de alecrim obtidos por trituração e infusão apresentaram efeito citotóxico sobre sementes de alface, porém o extrato obtido por decocção não demonstrou tal efeito.

Pelo teste de AMES, Gomes-Carneiro et al., (1998) observaram que o composto 1,8 – cineol não apresenta toxicidade. Henriques et al., (2009) relatam que dados de citotoxicidade *in vitro* têm sido utilizados para predizer ou estimar irritações cutâneas e correlações entre os dados *in vitro* e *in vivo* e entre outros, o 1,8 – cineol apresenta algum grau de citotoxicidade.

Maistro et al. (2010) investigaram o potencial genotóxico e mutagênico do óleo essencial de *R. officinalis* em roedores, utilizando os testes de micronúcleo em medula óssea, cometa e aberrações cromossômicas. Os animais foram tratados por gavagem com três dosagens de óleo de alecrim (300, 1000 ou 2000 mg . kg<sup>-1</sup>). Células do sangue periférico e do fígado foram colhidos de camundongos 24 horas após o tratamento. Com base no teste do cometa, todas as três doses de óleo de alecrim induziram danos consideráveis no DNA. Houve aumento significativo nos micronúcleos e aberrações cromossômicas só nas duas doses mais elevadas, concluindo que o óleo essencial de alecrim provoca efeitos genotóxicos e mutagênicos, quando administrado por via oral.

Autores alertam que o uso do alecrim deve ser controlado em gestantes e o risco maior de *R. officinalis* está relacionado ao aumento da motilidade uterina causando aborto (CARDOSO et al., 2000; VEIGA JUNIOR e PINTO, 2005).

A fim de avaliar se o alecrim é capaz de induzir o aborto e/ou interferir com o desenvolvimento normal dos conceitos, Lemonica et al. (1996) administraram extrato aquoso (13 mg de sólidos . ml<sup>-1</sup>) de *R. Officinalis*, obtido de folhas, flores e tronco na dose de 26 mg a 30% (w / v), através de gavagem durante dois períodos diferentes da gestação de ratos Wistar. Um grupo de animais recebeu o extrato nos dias 1-6 de gestação (período pré-implantação) e outro grupo recebeu o mesmo extrato nos dias 6-15 (período de organogênese). Os grupos controle receberam solução salina no mesmo volume e durante os mesmos períodos como seus respectivos grupos experimentais. O tratamento das mães durante o período pré-implantação ou o organogênico não causou alterações significativas na perda pós-implantação ou no número de anomalias e

malformações dos fetos nascidos à termo. A percentagem de perda pré-implantação, no grupo tratado antes da implantação do embrião foi aumentada, embora a diferença não tenha sido significativa em comparação com o controle. Com este resultado os autores sugerem que o extrato de alecrim pode apresentar um efeito anti-implantação, sem interferir com o desenvolvimento normal do conceito, após o implante.

Estudo verificou o mecanismo pelo qual o extrato aquoso de alecrim influencia a implantação do embrião, correlacionando a sua ingestão com possíveis alterações no desenvolvimento do embrião. O extrato foi administrado a ratas Wistar em duas doses: 260 e 1040 mg . kg<sup>-1</sup>, por via oral, do dia 1 ao dia 4 de gestação, uma vez por dia. Em seguida, cada um dos grupos foi subdividido e eutanasiado em duas fases distintas: a metade dos animais no dia 5, para avaliação dos blastocistos antes da implantação e a outra no dia 21, para a avaliação fetal. O tratamento com 260 mg . kg<sup>-1</sup> causou aumento significativo no número de embriões anômalos coletados do útero no dia 5, apresentando efeito tóxico no feto. No entanto, os embriões que conseguiram implantar apresentaram desenvolvimento normal. A administração de 1040 mg . kg<sup>-1</sup> do extrato não apresentou qualquer efeito embriotóxico. No entanto, no dia 5, um decréscimo de 40% do número de blastocitos presentes no útero foi observada. Este fato sugere que o tratamento com a dose mais elevada causou maior retenção de embriões no oviduto (DAMASCO e LEMONICA, 1999).

O óleo essencial de *Origanum vulgare*, também pertencente à família Lamiaceae, avaliado nas concentrações de 3, 9 e 27%, causou alteração com diminuição da fertilidade de ratos machos tratados antes (70 dias) e durante (21 dias) o acasalamento (HOLLEMBACH et al., 2015). Em uma avaliação preliminar da toxicidade de *Rosmarinus officinalis* no sistema reprodutor e em órgãos de ratos Wistar machos, Sá et al. (2006), administraram 1 mL do extrato aquoso de *R. officinalis* na dose de 291,2 mg e 582,4 mg . kg<sup>-1</sup> de massa corporal por cinco dias. O peso corporal e de órgãos, a produção de espermatozoides e o consumo de ração foram avaliados. Os resultados mostraram que a administração da dose menor do extrato não alterou significativamente o peso corporal e de órgãos e nem interferiu com a produção de gametas, os animais tratados com a maior dose demonstraram aumento significativo de peso na vesícula seminal, entretanto, nenhuma outra alteração significativa foi encontrada.

A ingestão de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) foi investigada por seus efeitos sobre a fertilidade em ratos adultos Sprague-Dawley machos, em níveis de 250 e 500

mg . kg<sup>-1</sup> por 63 dias. A massa corporal e os pesos absoluto e relativo dos testículos não foram afetados, mas os pesos médios dos epidídimos, próstata, vesículas seminais e glândula prepuccial diminuíram significativamente. Houve declínio na espermatogênese em decorrência de diminuição no número de espermátócitos e espermátides no grupo tratado (500 mg . kg<sup>-1</sup>), atribuído a um decréscimo significativo nos níveis de testosterona. Além disso, nas fêmeas, o tratamento aumentou acentuadamente o número de reabsorções fetais em ratas emprenhadas pelos machos do grupo 500 mg . kg<sup>-1</sup>, reduzindo assim a sua fertilidade (NUSIER et al., 2007).

Outro estudo com o objetivo de verificar os efeitos do extrato de *Rosmarinus* como contraceptivo em ratos machos utilizou 30 animais divididos em três grupos: um grupo controle que recebeu água destilada, um grupo que recebeu 250 mg . kg<sup>-1</sup> do extrato e outro grupo que recebeu a dose de 500 mg . kg<sup>-1</sup>, ambos administrados pela via oral e durante três meses. A menor dose (250 mg . kg<sup>-1</sup>) apresentou pouco efeito sobre a histologia das células germinativas testiculares. Já a dose maior provocou: compactação da maioria dos túbulos seminíferos; membrana basal enrugada; a maioria dos túbulos não revelaram nenhuma célula típica de espermatogênese; espermátides jovens apareceram polimórficas e diminuição do número de espermátides maduras em comparação ao grupo controle. Desta forma, os autores caracterizam a maior dose como potencial causadora de infertilidade, mas ressaltam a importância do isolamento do componente ativo responsável por esta ação, bem como seu mecanismo de ação (EL-DIN et al., 2012).

### **3.2 Avaliação Toxicológica**

A legislação brasileira e internacional exige que fitoterápicos e fármacos sejam produzidos ou disponibilizados no mercado para consumo somente após a avaliação rigorosa de suas características. Para tal, devem ser realizados testes que determinem suas atividades toxicológicas e o seu potencial mutagênico (SILVA et al., 2003).

Os principais protocolos a serem realizados são os emitidos pela Europa através da *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD), pelos Estados Unidos da América através do *Food and Drug Administration* (FDA), ou ainda, Canadá, Ásia e Japão (SILVA et al., 2003).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o órgão regulador para registro de medicamentos fitoterápicos de uso humano e prevê a realização de estudos de toxicidade pré-clínica. O guia emitido por esse órgão tem por objetivo indicar métodos padronizados para os estudos de toxicologia pré-clínica para fitoterápicos incluindo toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas (longa duração), e avaliação toxicológica de medicamentos fitoterápicos de uso tópico. Os ensaios de toxicidade reprodutiva estão previstos quando o medicamento for indicado para administração de longa duração ou para gestantes (ANVISA, 2004).

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), órgão responsável pelo registro de medicamentos para uso veterinário, apresenta as mesmas exigências quanto à avaliação toxicológica previsto em suas normativas Decreto 5.053 de 2004 e Portaria 54 de 1999.

### 3.2.1 Testes sobre toxicidade reprodutiva

A avaliação da Toxicologia Reprodutiva compreende um estudo complexo. Entende-se por reprodução o processo biológico que assegura a continuidade das espécies, possibilitando que o material genético existente seja passado às gerações seguintes. Assim sendo, o ciclo reprodutivo não versa apenas na concepção, prenhez e nascimento, mas tem início com a produção de gametas nos genitores (no período pré-natal), continuando pela fertilização e desenvolvimento embrionário e fetal, nascimento e desenvolvimento pós-natal até a maturidade sexual, quando o descendente adulto torna-se capaz de procriar (MELLO, 2007).

Os agentes químicos podem afetar o ciclo reprodutivo em qualquer das suas diferentes fases, impedindo ou inibindo temporariamente a reprodução e/ou causando defeitos de desenvolvimento na prole exposta. Nas fases pré e pós-natal, os órgãos sexuais e o sistema nervoso central que ainda estão se diferenciando, podem ser atingidos por substâncias presentes no sangue materno através da placenta durante a gestação ou através do leite durante a lactação (ZENICK e KLEGG, 1989). Desta forma os estudos de toxicidade reprodutiva devem ser igualmente abrangentes para que se possam detectar diferentes tipos de agravos nas diferentes fases do ciclo reprodutivo (LEMONICA, 2001).

Exposição pré-natal e pós-natal a produtos tóxicos podem produzir mudanças que não podem ser previstas a partir dos efeitos observados em adultos, e esses efeitos são muitas vezes irreversíveis. Resultados adversos no desenvolvimento, em ambos os sexos podem resultar de exposição a agentes tóxicos no útero ou no leite (EPA, 1996).

Assim, os estudos de toxicidade reprodutiva adaptados de normas da Environmental Protection Agency (EPA), recomendados por OECD e FDA, e a serem realizados durante a execução deste projeto, abrangem três segmentos:

- Segmento I “Toxicidade crônica e reprodutiva” onde é realizada a avaliação de efeitos sobre a fertilidade de machos e fêmeas antes e durante o acasalamento.
- Segmento II “Toxicidade pré-natal – estudo de teratogenicidade”, com exposição da progênie durante a fase de organogênese.
- Segmento III “Toxicidade peri e pós-natal” onde são avaliados os efeitos sobre o desenvolvimento pré e pós-natal de progênies expostas durante as fases de desenvolvimento fetal e lactação.

Para estudos de toxicologia, frequentemente utilizam-se ratos Wistar, uma linhagem de ratos albinos. São preconizados por serem animais dóceis e por possuírem excelente desempenho reprodutivo. Os machos atingem a maturidade sexual logo após a puberdade (entre 60 e 75 dias de vida), sua fertilidade máxima encontra-se entre 100 e 300 dias, e a senescência reprodutiva ocorre aproximadamente aos 360 dias de idade (EBISUI et al., 2009).

A melhor maneira para revelar efeitos reprodutivos induzidos por xenobióticos é investigar todos os parâmetros possíveis. Há vários anos os investigadores monitoram, com maior assiduidade, o comportamento animal quando se estudam os efeitos reprodutivos de substâncias exógenas (CHAHOUUD e FAQI, 1998; FAQI et al., 1998).

Durante as avaliações toxicológicas, é necessário proceder algumas análises comportamentais dos animais testados (BENNETI, 2005). A atividade de acasalamento entre ratas no período de estro e machos sexualmente experientes tem a finalidade de testar o comportamento sexual masculino (CHAHOUUD e FAQI, 1998), já o comportamento da rata lactante com sua ninhada objetiva garantir o bem-estar e atestar que as manipulações inofensivas e os estímulos estressores não estão induzindo alterações endócrinas e comportamentais na idade adulta, já que estes efeitos poderiam ser associados ao comportamento maternal, em que a mãe estimula com mais frequência e intensidade seus filhotes (BENNETI, 2005).

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

Em ratos, o equivalente ao terceiro trimestre gestacional humano ocorre após o nascimento, ou seja, o período pós-organogênese é extrauterino, sendo os 7-10 primeiros dias de vida pós-natal o período que representa o maior crescimento neuronal (WEINBERG et al., 2008).

Indivíduos expostos durante períodos críticos de desenvolvimento são mais vulneráveis à ação de substâncias químicas em função de menor capacidade metabólica e excretora e da ausência de muitos mecanismos de retroalimentação do sistema endócrino (ZENICK e KLEGG, 1989). Cada um dos sistemas em formação apresenta um período crítico específico em que encontram-se mais suscetível ao agente e quanto maior for este período, maior também será a suscetibilidade (BERNARDI, 2014). Os períodos críticos do desenvolvimento do rato estão ilustrados na Figura 3.

		Dias de gestação																Dias de lactação		
		1-5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	1 – 21 pós-natal	
		Implantação	Organogênese										Desenvolvimento fetal						Neonatal	
Divisão do zigoto Implantação Formação do blastocisto	Olho																			
	Cérebro																			
	Coração e arcos aórticos																			
	Esqueleto axial																			
	Palato																			

**Figura 3.** Períodos de desenvolvimento dos diferentes órgãos e sistemas do rato. Adaptado de Bernardi, 2014.

#### 4 METODOLOGIA E RESULTADOS

O presente estudo apresenta os métodos utilizados e os resultados obtidos na forma de artigos. Foram escritos três artigos conforme descrito a seguir:

ARTIGO I - Efeitos da exposição fetal e lactacional ao óleo essencial de alecrim e 1,8 cineol no desenvolvimento e reprodução de ratos descendentes.

ARTIGO II – Avaliação dos efeitos do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* e 1,8 cineol na reprodução utilizando testes de fertilidade em ratos Wistar.

ARTIGO III - Avaliação dos efeitos do óleo essencial de alecrim e seu composto majoritário (1,8 cineol) sobre a fertilidade de ratas e morfologia óssea dos fetos.



### *CAPÍTULO III*

#### ARTIGO 1

#### **ARTIGO 1. EFEITOS DA EXPOSIÇÃO FETAL E LACTACIONAL AO ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM E 1,8 CINEOL NO DESENVOLVIMENTO E REPRODUÇÃO DA PROLE DE RATOS**

#### **EFFECTS OF FETAL AND LACTATIONAL EXPOSURE TO ROSEMARY ESSENTIAL OIL AND 1,8 CINEOLE ON DEVELOPMENT AND REPRODUCTION IN RATS OFFSPRING**

Luciana Dalazen dos Santos<sup>a,\*</sup>, Luiz Carlos Klein-Júnior<sup>c</sup>, Andrea dos Santos Dantas<sup>a</sup>,  
Marina Paula Lorenzetti<sup>d</sup>, David Driemeier<sup>a,d</sup>, Priscila Ramires da Silva<sup>b</sup>, Fernanda  
Bastos de Mello<sup>b</sup>, João Roberto Braga de Mello<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica – Farmacologia e Toxicologia Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>d</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

\* Autor para correspondência: Luciana Dalazen dos Santos; Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil; lu\_dalazen@hotmail.com

**RESUMO** - O óleo essencial do alecrim vem sendo alvo de estudos pelas suas propriedades anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante. Um dos compostos desse óleo, o 1,8 cineol, também chama a atenção pelos benefícios para a memória e neuroproteção. Durante a gestação os fetos estão suscetíveis às substâncias ingeridas pela fêmea gestante podendo levar ao aparecimento de alterações tóxicas na prole. Dessa maneira, nesse estudo foram investigados os efeitos do óleo essencial de alecrim (OEA) e seu composto majoritário (1,8-cineol) na prole de ratos Wistar a partir da exposição materna. Ratos adultos machos foram tratados 70 dias antes e durante o acasalamento, e as fêmeas, 14 dias antes do acasalamento e nos 21 dias de acasalamento, gestação e lactação. Machos e fêmeas foram acasalados e a progênie dividida em cinco grupos experimentais de acordo com o tratamento dos pais em: CN (controle negativo – Tween 80), C3 (OEA 300 mg.kg<sup>-1</sup>), C6 (OEA 600 mg.kg<sup>-1</sup>), C12 (OEA 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e CE (1,8 cineol 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>). A progênie foi avaliada através do comportamento e sinais de toxicidade materna, parâmetros reprodutivos e comportamentos em campo aberto e sexual, peso e histologia de órgãos e desenvolvimento físico e geral. Não foram observados sinais de toxicidade materna. No PPD 2 os animais dos grupos C6 (27,8s) e C12 (28,73s) levaram mais tempo para

concluir o reflexo de endireitamento em superfície, o que também ocorreu para os animais do grupo C6 (12,27s) no PPD4. Os animais do grupo C6 (19,45s) e C12 (20,70s) também tiveram aumento do tempo no reflexo de geotaxia no PPD2. O grupo C3 demonstrou maior comportamento exploratório no teste de campo aberto, com aumento da frequência de entrada (14,73) no centro e diminuição de *grooming* (0,54) quando comparados ao grupo controle. Houve aumento da testosterona sérica (7,98 ng/mL) e do número de espermatozoides ( $624,37 \times 10^6$ ) na prole do grupo CE. Os resultados sugerem que a exposição maternal ao óleo essencial de alecrim altera os reflexos nos primeiros dias pós-natal da prole e causa alteração no comportamento exploratório na menor dose e ainda, que o 1,8 cineol altera parâmetros reprodutivos através da hipersecreção de testosterona e aumento do número de espermatozoides.

**Palavras chave:** Alecrim. Óleo essencial. Reprodução.

**ABSTRACT** - Rosemary essential oil has been studied for its anti-inflammatory, antimicrobial and antioxidant properties. One of the compounds of this oil, 1,8 cineol, also draws attention to the benefits to memory and neuroprotection. During pregnancy the fetuses are susceptible to the substances ingested by the pregnant female and may lead to the appearance of toxic changes in the offspring. Thus, in this study, the effects of rosemary essential oil (OEA) and its major compound (1,8-cineol) on offspring of Wistar rats were investigated from maternal exposure. Male adult rats were treated 70 days before and during mating, and females, 14 days before mating and during 21 days of mating, gestation and lactation. Males and females were mated and the progeny divided into five experimental groups according to parental treatment in: NC (negative control - Tween 80), C3 (REO  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), C6 (REO  $600 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), C12 (REO  $1200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) e CE (1,8 cineol  $134,55 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Progeny were evaluated through maternal behavior and signs of toxicity, Reproductive parameters and behaviors in the open and sexual field, organ weight and histology, and physical and general development. No signs of maternal toxicity were observed. In PPD 2 the animals of groups C6 (27,8s) and C12 (28,73s) took longer to complete the surface righting reflex, which also occurred for the animals of the C6 group (12,27s) in PPD4. The animals of group C6 (19,45s) and C12 (20,70s) also had increased time in the geotaxia reflex in PPD2. The C3 group showed higher exploratory behavior in the open field test, with an increase in the entrance frequency in the center (14,73) and a decrease in grooming (0,54), when compared to the control group. There was an increase in serum testosterone (7,98 ng / mL) and the number of spermatozoa ( $624.37 \times 10^6$ ) for the CE group. The results suggest that maternal exposure to essential oil of rosemary alters the reflexes in the first postnatal days of offspring and causes alteration in the exploratory behavior at the lowest dose and still, that 1,8 cineol changes reproductive parameters through hypersecretion of testosterone and increase in the number of spermatozoa.

**Key words:** Rosemary. Essential oil. Reproduction.

## 1. INTRODUÇÃO

O *Rosmarinus officinalis* L., comumente conhecido como alecrim, é uma planta pertencente à família Lamiacea, nativa da região Mediterrânea e amplamente distribuída pelo mundo todo. Seu uso medicinal é referido na literatura etnofarmacológica, que cita o emprego de suas folhas na medicina tradicional de vários países na forma de infusão, especialmente nos casos de má digestão, gases no aparelho digestivo, dor de cabeça, dismenorreia, fraqueza e baixa capacidade de memorização. As folhas, flores e frutos secos formam também uma excelente mistura para uso na culinária (ULBRICHT et al., 2010). Há muito tempo, o óleo essencial e seus constituintes são estudados pelas suas propriedades terapêuticas, tal qual, o estímulo à atividade locomotora (KOVAR et al., 1987), capacidade antioxidante, antimicrobiana (GAKAR et al. 2007; IRKIN et al. 2011; SIENKIEWICZ et al., 2013; BAN et al., 2016; WALLER et al., 2016) e antidiabetogênica (BAKIREL, et al., 2008). Recentemente, os estudos se concentram com importante relevância nos efeitos do óleo essencial e seus compostos, especialmente o 1,8 cineol, no sistema nervoso central com ação neuroprotetora (MANNELLI et al., 2016) ansiolítica e antidepressiva (SASAKI et al., 2013; FERLEMI et al., 2015).

A exposição pré-natal (uterina) e pós-natal (através do leite materno), a xenobióticos, pode produzir alterações muitas vezes irreversíveis no desenvolvimento, em ambos os sexos (EPA, 1996). O feto é especialmente vulnerável a danos em virtude da exposição a compostos químicos que atravessam a placenta e/ou a barreira cerebral ainda imatura, além disso, durante o seu desenvolvimento existem períodos que são críticos para a evolução normal (RICE & BARRONE, 2000; COSTA et al., 2004). É provável que metabólitos de óleos essenciais atravessem a placenta devido ao íntimo (mas não direto) contato entre o sangue materno e embrionário ou fetal. Substâncias lipofílicas podem migrar por difusão passiva entre estas duas circulações e atingir níveis equivalentes entre o sangue materno e fetal, são biotransformadas em compostos polares e podem se acumular no concepto (BURFIELD, 2000). Lemonica et al. (1996) sugerem que o extrato de alecrim pode apresentar um efeito anti-implantação, sem interferir com o desenvolvimento normal do feto, após o implante. Outros estudos ainda relatam a interferência do óleo essencial no sistema reprodutor de ratos machos adultos (SÁ et al., 2006; NUSIER et al., 2007; EL-DIN et al., 2012). Porém, as informações a respeito dos

efeitos deste óleo no desenvolvimento reprodutivo e comportamental de ratos expostos durante os períodos peri e pós-natal ainda são escassas.

Conseqüentemente, neste estudo foram investigados os efeitos do óleo essencial de alecrim (OEA) e seu composto majoritário (1,8-cineol) na prole de ratos Wistar a partir da exposição materna. A prole teve seu acompanhamento de desenvolvimento corporal, reprodutivo e comportamental e as fêmeas o comportamento materno. Dessa forma, foi possível avaliar se a exposição durante este período tem efeito significativo no desenvolvimento normal esperado durante essa fase.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Insumos

Foi utilizado óleo essencial de alecrim (OEA) comercial, adquirido da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil), com certificação de qualidade. A análise qualitativa e quantitativa do óleo foi realizada no laboratório do Instituto de Química da UFRGS, Porto Alegre/RS, por cromatografia gasosa com detector de massas, injetor split/splitless, GC/MS Shimadzu QP-5050A. Fazem parte dos demais insumos obtidos para o estudo, o 1,8-cineol (Sigma, Solon, OH, USA) e kits de testosterona total (IBL International GmbH, Hamburg, Germany).

### Animais, protocolo experimental e tratamentos

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS, Porto Alegre, RS, número 26988.

Para avaliar os efeitos do óleo essencial de alecrim e seu composto majoritário (1,8-cineol) no comportamento e desenvolvimento corporal e sexual de ratos Wistar, foram utilizados 50 machos e 125 fêmeas nulíparas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), acasalados em uma proporção de três fêmeas para cada macho. O início da gestação (GD0) foi constatado através de esfregaço vaginal contendo espermatozoides. O óleo essencial de alecrim e o 1,8-cineol foram administrados para os progenitores (machos e fêmeas) uma vez ao dia, via oral (gavagem) em um volume de 1mL/100g de peso corporal. Machos foram tratados 70 dias antes e durante o acasalamento e as fêmeas 14 dias antes do acasalamento e nos 21 dias de acasalamento, gestação e lactação. As doses do óleo essencial de *Rosmarinus*

*officinalis* foram estabelecidas de acordo com estudos prévios de atividade antimicrobiana *in vitro* realizados por Santin (2013). A progênie foi dividida em cinco grupos experimentais de acordo com o tratamento dos pais:

*Grupo I* – Controle negativo, descendentes de fêmeas e machos tratados com o veículo da preparação da solução de tratamento, Tween 80 (3%).

*Grupo II* – Composto majoritário (134,55 mg.kg<sup>-1</sup>), descendentes de fêmeas e machos tratados com solução de 1,8 cineolna concentração 44,85% (proporcional à quantidade do composto na solução de óleo essencial 12%).

*Grupo III* – Dose 1 (300 mg.kg<sup>-1</sup>), descendentes de fêmeas e machos tratados com óleo essencial de alecrim 3% em emulsão contendo Tween 3%.

*Grupo IV* – Dose 2 (600 mg.kg<sup>-1</sup>), descendentes de fêmeas e machos tratados com óleo essencial 6% em emulsão contendo Tween 3%.

*Grupo V* – Dose 3 (1.200 mg.kg<sup>-1</sup>), descendentes de fêmeas e machos tratados com óleo essencial 12% em emulsão contendo Tween 3%.

Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em biotério sob condições constante de umidade (50% ± 5), temperatura (21°C ± 2), ciclo de luz claro/escuro de 12h e alimentados com ração comercial (Nuvital CR 1, Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum*.

#### Avaliação do comportamento materno

O comportamento materno foi avaliado com adaptações de Arrati et al. (2006), Champagne et al. (2003), Pereira e Ferreira (2006), Souza et al. (2010) e Souza et al. (2012) nos dias 1, 5 e 10 pós-natal, durante o ciclo claro e antes do tratamento das mães. A rata lactante foi removida da sua caixa moradia e o ninho foi destruído. Os filhotes foram aleatoriamente distribuídos no lado oposto ao ninho desfeito e após 1 minuto a fêmea foi recolocada na caixa. O comportamento foi filmado em câmera digital durante 25 minutos, e os seguintes parâmetros foram avaliados: tempo da mãe envolvida em lamber os filhotes; tempo dispensado na construção do ninho; qualidade do ninho (escore de 0 a 3, onde 0 = ausência de ninho; 1 = ninho pobre no qual não foi usado todo o material disponível; 2 = ninho com paredes; 3 = ninho excelente com uso de todo o material disponível) e tempo dispensado na amamentação e cuidados com a progênie.

### Avaliação da prole

No primeiro dia pós-natal (PND1) os filhotes foram contados, sexados e selecionados, aleatoriamente, oito filhotes por fêmeas, sempre mantendo a mesma proporção de machos e fêmeas, quando possível. Foi mensurado o peso dos filhotes individualmente nos dias PND7, 14, 21, 28, 35, 42 e 49. Cada filhote foi avaliado quanto ao desenvolvimento físico geral como recomenda OECD 416 (OECD, 2001) para as seguintes características: dia do aparecimento da penugem, dia do descolamento dos pavilhões auriculares, dia do desenvolvimento do pelo, dia da erupção dos dentes incisivos, dia da abertura dos olhos, dia da descida dos testículos e o dia da separação prepucial.

### Separação prepucial

Para determinar a idade à puberdade, foi avaliada a separação balanoprepucial, que consiste na separação da membrana prepucial e externalização da glândula do pênis (KORENBROT et al., 1977). Este procedimento foi iniciado no PND33 e continuado, uma vez ao dia até a constatação da separação balanoprepucial através da cuidadosa manipulação do tecido.

### Desenvolvimento físico geral

Os reflexos dos filhotes foram avaliados individualmente e de acordo com adaptações de Castro et al. (2000) e Castro (2006). Do PND2 ao PND5 foi avaliado o Reflexo de Endireitamento, onde cada animal foi colocado em decúbito dorsal e cronometrado o tempo gasto para ele voltar ao decúbito ventral. Do PND7 ao PND10 foi avaliada a Geotaxia Negativa, onde o animal foi colocado com as quatro patas em um plano inclinado de 30°, com a cabeça voltada para o lado mais baixo e cronometrado o tempo até o animal reorientar o corpo com um giro de 180°. Do PND14 ao PND17, os animais foram seguros pela cauda e encorajados a agarrar-se com os dois membros anteriores em uma barra cilíndrica, ficando suspensos; foi cronometrado o tempo que o animal conseguiu ficar suspenso, avaliando assim, a Resposta de Agarrar.

O desmame foi realizado no PND21 e, no PND65 um macho e uma fêmea de cada ninhada foram selecionados aleatoriamente e eutanasiados para a avaliação da histologia e peso de órgãos.

### Peso e histologia dos órgãos

Dos machos e fêmeas, no PND65, foram coletados rins, fígado, baço e coração, com vistas à avaliação de possíveis alterações macroscópicas. A massa de cada órgão foi mensurada e relacionada com a massa corporal do indivíduo. Dos órgãos sexuais masculinos, passaram pelo mesmo procedimento: testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata e vesícula seminal, esta última foi drenada antes da pesagem. Dos órgãos sexuais femininos, passaram também pelo procedimento acima descrito os ovários e o útero. Todos os órgãos, exceto um testículo por animal, foram fixados em solução de formalina tamponada. Um testículo por grupo foi fixado em solução de Bouin, tratado com álcool, embebido em parafina e cortes de 5µm foram preparados em lâminas e corados com hematoxilina eosina. Todos os órgãos foram examinados no Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

### Dosagem de testosterona total

No dia da eutanásia (PND65), os machos foram anestesiados e submetidos à celiotomia. As coletas de amostras sanguíneas foram obtidas a partir de venopunção da veia cava caudal sob visualização direta e o soro, então, acondicionado em microtubo e armazenado a -20°C. A testosterona foi mensurada por radioimunoensaio (ELISA, Bio-Tek Instruments ELX800, USA) usando kits comerciais para testosterona total (IBL International GmbH, Hamburg, Germany).

### Avaliação espermática

No PND 65 as contagens espermáticas foram realizadas de acordo com o que foi previamente descrito por Piffer et al. (2009) e Robb et al. (1978). Os testículos e epidídimos foram pesados, a túnica albugínea removida e o parênquima homogeneizado em 5mL de solução salina contendo Triton 0,5%, seguindo a sonicação por 30s. As amostras foram diluídas 10 vezes em solução salina e as espermátides maduras resistentes foram contadas nos quatro quadrantes laterais do hemocitômetro. Os valores foram subsequentemente divididos por 6,1 dias para calcular a produção diária de espermatozoides. A cauda do epidídimo foi cortada, homogeneizada e diluída como o descrito para os testículos e nessa, foram contados os espermatozoides nos quatro quadrantes laterais do hemocitômetro.

As características morfológicas espermáticas (alterações em cabeça ou cauda do espermatozoide) foram analisadas através de esfregaço do lavado do ducto deferente (0,1mL) em lâmina corada com eosina 2% (0,1mL). Foram analisados 200 espermatozoides por animal em microscópio óptico.

#### Teste de comportamento em campo aberto

No PND75, um macho de cada grupo teve seu comportamento testado através do teste de campo aberto com adaptações de Asano (1989). Cada animal foi colocado em uma arena quadrática de 1m<sup>2</sup> com paredes de 50 cm de altura e base dividida em quadrantes de 20 cm<sup>2</sup> perfazendo divisão de 25 quadrados. O comportamento do animal foi registrado em vídeo durante 5 minutos. O teste foi realizado durante o ciclo claro e foram analisadas as seguintes categorias comportamentais: frequência de entrada no centro, frequência de entrada na periferia, permanência sobre as duas patas traseiras (*rearing*), frequência de locomoção, tempo de imobilidade, autolimpeza (*grooming*) e quantidade de bolos fecais.

#### Teste de comportamento sexual

O teste de comportamento sexual foi realizado no PND100 com adaptações de Felicio et al. (1989) e Chiavegatto et al. (1989). Quinze casais dentro de cada grupo foram formados. As fêmeas em estro foram selecionadas, mediante análise da citologia vaginal, para o acasalamento. Os parâmetros avaliados foram: latência para a primeira monta, latência para a primeira intromissão, latência para a primeira ejaculação, número de intromissões até a primeira ejaculação, número de montas incompletas até a primeira ejaculação, total de montas incompletas e intromissões até a primeira ejaculação, total de montas incompletas e intromissões no tempo total de observação, latência para a primeira monta após a primeira ejaculação, número de ejaculações, eficiência copulatória e índice de atividade sexual este, conforme proposto por Agmo et al. (1987).

#### Análise dos testes de comportamento

Todos os testes de comportamento realizados foram registrados usando câmera de vídeo digital e analisados através do software Behavsoft® (patente pendente). Este programa permite uma análise precisa do comportamento em tempos selecionados pelo usuário, através de uma única interface usando comandos de atalho do teclado (COSTA et al., 2015).



### Análise estatística

As variáveis em questão foram primeiramente submetidas a teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de Bartlett para homocedasticidade. A análise estatística incluiu a análise de variância de uma via (ANOVA), Kruskal-Wallis e qui-quadrado. As variáveis quantitativas seguiram o teste de Bonferroni e as qualitativas qui-quadrado ou Kruskal-Wallis. Todas as análises foram executadas usando Statistica 7.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando o valor de  $P$  foi menor que 0,05. Os valores foram expressos como média e erro padrão da média ( $\pm$ EPM).

## 3. RESULTADOS

### Análise cromatográfica do óleo essencial de alecrim

O óleo essencial utilizado neste estudo foi adquirido de distribuidor comercial, portanto, com o objetivo de definir os compostos majoritários e atestar a pureza do óleo, foi realizada a análise cromatográfica, demonstrando o 1,8 cineol como o composto majoritário (44,85%) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química majoritária do óleo essencial comercial de *Rosmarinus officinalis* L.

Nome do composto	Porcentagem (%)
1,8-cineol	44,85
Cânfora	17,21
Alfa-pineno	13,83
Beta-pineno	10,70

### Comportamento materno

O comportamento materno foi avaliado através da observação, em vídeo, do comportamento da mãe em relação aos seus filhotes. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle ( $P > 0,05$ ), para: tempo da mãe envolvida em lambar os filhotes, tempo dispensado na construção do ninho, qualidade do ninho e tempo dispensado na amamentação e cuidados com a progênie.

### Evolução da massa corporal

Os resultados de evolução da massa corporal da prole demonstram que não ocorreram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados e o grupo controle ( $P > 0,05$ , Figura 1).

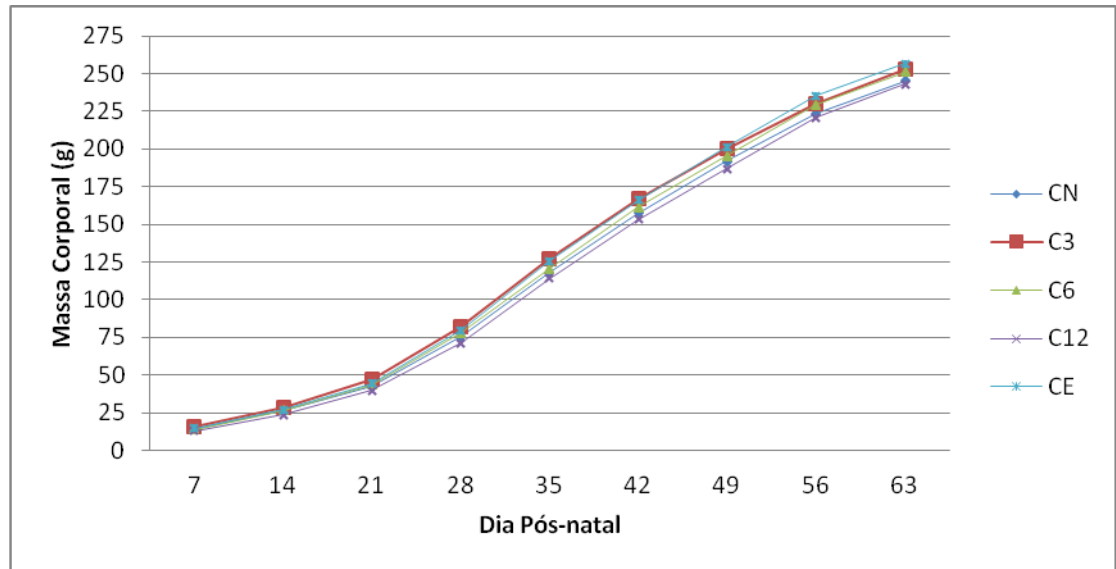


Figura 1. Evolução da massa corporal (g) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante gestação e lactação. Dados expressos em média. (n= 134, 124, 142, 124 e 133 respectivamente).

### Desenvolvimentos geral e sexual da progênie

Houve diferença estatisticamente significativa para o dia da manifestação ( $P > 0,05$ , Tabela 1). Não houve diferença estatística significativa para o dia de aparecimento das características sexuais da progênie exposta ao OEA e o 1,8 cineol quando comparadas ao grupo controle ( $P > 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Tempo médio (dias) para o aparecimento das características de desenvolvimento geral e sexual da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante gestação e lactação. Dados expressos em dias médios  $\pm$  EPM e limites inferior e superior. (n= 134, 124, 142, 124 e 133 respectivamente).

Característica	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Descolamento de orelhas	2,85 $\pm$ 0,07 (2 - 4)	2,88 $\pm$ 0,04 (2 - 4)	3,03 $\pm$ 0,05 (2 - 4)	3,00 $\pm$ 0,04 (2 - 4)	2,73 $\pm$ 0,05 (2 - 4)
Aparecimento da penugem	5,18 $\pm$ 0,04 (5 - 6)	5,13 $\pm$ 0,03 (5 - 6)	5,06 $\pm$ 0,02 (5 - 6)	5,17 $\pm$ 0,03 (5 - 6)	5,13 $\pm$ 0,03 (5 - 6)

Continua

Continuação

Característica	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Erupção de incisivos	10,27 ± 0,08 (9 – 13)	10,67 ± 0,08 (9 – 14)	10,65 ± 0,10 (8 – 15)	10,61 ± 0,10 (9 – 13)	10,41 ± 0,09 (8 – 13)
Abertura dos olhos	14,20 ± 0,11 (12 – 16)	13,87 ± 0,07 (11 – 15)	13,99 ± 0,09 (12 – 17)	13,86 ± 0,13 (9 – 15)	13,88 ± 0,06 (13 – 16)
Descida dos testículos	17,30 ± 0,22 (15 – 21)	17,18 ± 0,24 (15 – 22)	17,29 ± 0,24 (15 – 24)	17,73 ± 0,18 (15 – 21)	17,60 ± 0,23 (15 – 22)
Separação prepucial	37,96 ± 0,53 (32 – 48)	38,00 ± 0,76 (28 – 47)	38,44 ± 0,73 (29 – 49)	37,96 ± 0,62 (29 – 48)	41,82 ± 0,62 (35 – 50)
Abertura do canal vaginal	36,46 ± 0,78 (29 – 47)	36,61 ± 0,48 (27 – 51)	37,30 ± 0,53 (31 – 46)	37,06 ± 0,60 (30 – 47)	36,13 ± 0,56 (31 – 44)

A figura 2 mostra as diferenças encontradas na avaliação do endireitamento em superfície da progênie exposta durante a gestação e lactação a diferentes concentrações do OEA e seu composto majoritário (1,8 cineol). A progênie da mãe que recebeu a dose de 600 mg.kg<sup>-1</sup> do OEA(C6) levou mais tempo para retornar ao decúbito ventral, tanto no PND2 quanto no PND4, quando comparada ao grupo controle ( $P < 0,01$ ). A progênie da mãe que recebeu 1.200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA(C12) apresentou aumento significativo no tempo ( $P < 0,01$ ) apenas no PND2, quando comparada ao grupo CN.

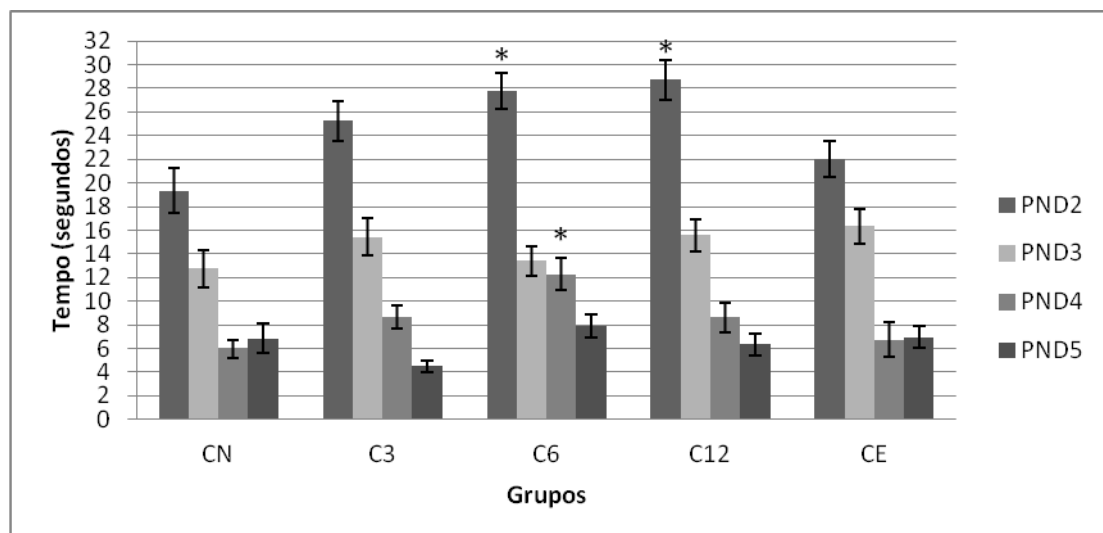


Figura 2. Característica de desenvolvimento comportamental (Endireitamento em Superfície) (segundos) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) nos dias pós-natal 2, 3, 4 e 5. Dados expressos em média ± EPM. \* Diferença significativa ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo controle (CN). ANOVA, seguida de teste de Bonferroni. ( $n = 134, 124, 142, 124$  e  $133$  respectivamente).

A geotaxia negativa foi avaliada nos PND 7, 8, 9 e 10, demonstrando diferença estatisticamente significativa no PND7 para os filhotes de mães tratadas com 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6) ( $P < 0,01$ ) e para filhotes de mães tratadas com 1.200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) ( $P < 0,05$ ) quando comparados ao grupo controle (Figura 3).

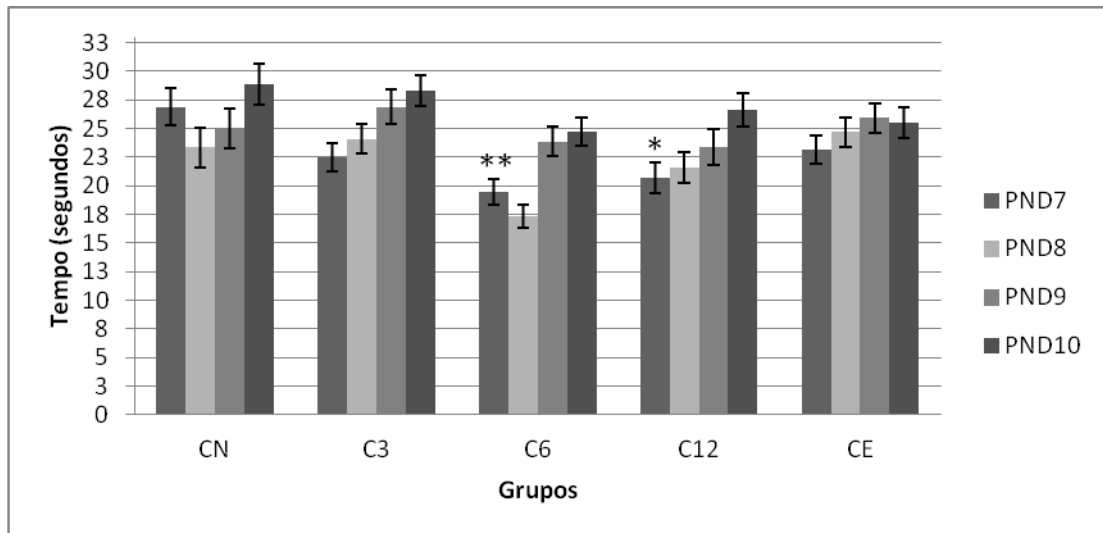


Figura 3. Característica de desenvolvimento comportamental (Geotaxia Negativa) (segundos) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) nos dias pós-natal 7, 8, 9 e 10. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. \* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo controle (CN). ANOVA, seguida de teste de Bonferroni. ( $n = 134, 124, 142, 124$  e  $133$  respectivamente).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os animais dos grupos estudados e o grupo controle na resposta de agarrar ( $P > 0,05$ , Figura 4).

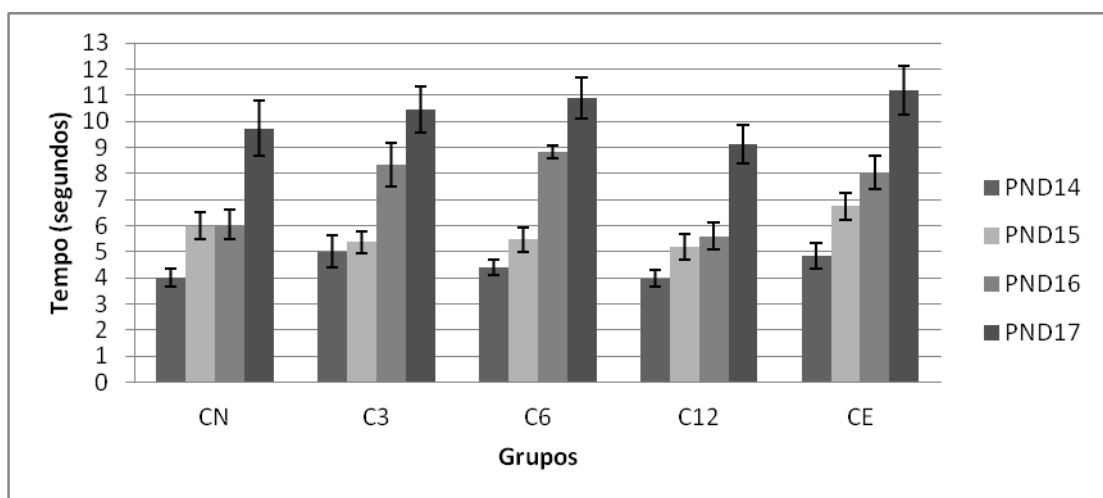


Figura 4. Característica de desenvolvimento comportamental (Resposta de Agarrar) (segundos) da progênie exposta ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) nos dias pós-natal 14, 15, 16 e 17. Dados expressos em média  $\pm$  EPM. Diferença não significativa entre os grupos,  $P > 0,05$  (ANOVA), teste de Bonferroni. ( $n = 134, 124, 142, 124$  e  $133$  respectivamente).

### Pesos de órgãos

Não houve diferença significativa para nenhum órgão, de machos ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3) e fêmeas ( $P > 0,05$ ) (Tabela 4), entre a progênie exposta durante a gestação e lactação a diferentes concentrações do OEA e seu composto majoritário (1,8 cineol) e o grupo controle.

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] dos machos púberes expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE). Os dados são média ± EPM.(n=15/grupo).

Peso relativo %	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Coração	0,31 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Baço	0,30 ± 0,02	0,30 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,29 ± 0,01
Fígado	4,10 ± 0,11	4,42 ± 0,23	4,50 ± 0,17	4,46 ± 0,14	4,32 ± 0,24
Rim direito	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,02
Testículo direito	0,53 ± 0,01	0,49 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,51 ± 0,02
Testículo esquerdo	0,54 ± 0,02	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,51 ± 0,02
Epidídimo direito	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,004	0,10 ± 0,004	0,10 ± 0,004	0,10 ± 0,01
Epidídimo esquerdo	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,005	0,10 ± 0,001	0,10 ± 0,005	0,10 ± 0,005
Próstata	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,005	0,06 ± 0,004	0,06 ± 0,004
Vesícula seminal	0,11 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,13 ± 0,01

Tabela 4. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] das fêmeas púberes expostas via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE). Os dados são média ± EPM. (n=15/grupo).

Peso relativo %	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Coração	0,31 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,30 ± 0,01	0,31 ± 0,01
Baço	0,33 ± 0,01	0,33 ± 0,01	0,32 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,01
Fígado	4,07 ± 0,14	4,18 ± 0,12	4,46 ± 0,11	4,02 ± 0,07	4,01 ± 0,07
Rim direito	0,39 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,41 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,38 ± 0,01
Rim esquerdo	0,36 ± 0,01	0,36 ± 0,02	0,40 ± 0,01	0,36 ± 0,01	0,37 ± 0,01
Ovário direito	0,03 ± 0,003	0,02 ± 0,001	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,002	0,03 ± 0,003

Continua

Continuação

Peso relativo %	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Útero	0,19 ± 0,01	0,18 ± 0,02	0,22 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,17 ± 0,01

### Análise Histológica

Os machos e as fêmeas expostos durante o período gestacional e lactacional ao OEA e composto majoritário, 1,8 cineol não apresentaram sinais de hepatotoxicidade na análise histológica, tampouco qualquer outra alteração para os outros órgãos avaliados.

### Índices de fertilidade de machos púberes

A exposição de machos durante os períodos gestacional e lactacional ao composto majoritário (1,8 cineol) do OEA, aumentou o número de espermatozoides ( $P < 0,01$ ) e a testosterona sérica dos animais ( $P < 0,05$ ). Para os demais índices, não foi encontrada diferença estatística significativa (Tabela 5).

Tabela 5. Índices de fertilidade dos machos púberes expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE). Os dados são média ± EPM ou percentual. ( $n=15$ /grupo).

	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Produção diária de espermatozoides (x 10 <sup>6</sup> )	77,79 ± 7,7	70,57 ± 12,0	73,55 ± 13,5	56,24 ± 12,8	108,00 ± 7,7
Número de espermatozoides (x 10 <sup>6</sup> )	315,45 ± 62,5	358,50 ± 59,6	368,18 ± 62,8	208,85 ± 23,6	624,37 ± 96,8**
Espermatozoides anormais (%)	10,8 ± 3,86	17,7 ± 7,02	11,80 ± 4,48	17,10 ± 5,03	12,55 ± 5,21
Testosterona sérica (ng/ml)	4,02 ± 0,62	5,64 ± 1,14	7,08 ± 0,55	6,99 ± 0,72	7,98 ± 0,36*

\*\* ( $P < 0,01$ ) \* ( $P < 0,05$ ) em relação ao grupo controle (CN), qui-quadrado ou ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

### Campo aberto

Os machos, filhos de mães que receberam 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA, durante a gestação e lactação, apresentaram aumento da frequência de entrada no centro, quando confrontados ao grupo CN ( $P < 0,05$ ), ainda para este mesmo grupo, o número de autolimpezas foi inferior quando comparado ao grupo CN ( $P < 0,01$ ). Para as demais

variáveis comportamentais observadas no campo aberto, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados e o controle ( $P > 0,05$ ) (Tabela 6).

Tabela 6. Comportamento em campo aberto de machos expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE). Os dados são média  $\pm$  EPM. ( $n=15$ /grupo).

Comportamento	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Frequência de entrada no centro	4,45 $\pm$ 1,41	14,73 $\pm$ 2,07*	10,64 $\pm$ 2,78	9,75 $\pm$ 3,01	4,5 $\pm$ 1,50
Frequência de entrada na periferia	76,73 $\pm$ 7,21	92,64 $\pm$ 10,50	85,73 $\pm$ 8,02	97,25 $\pm$ 4,43	85,5 $\pm$ 10,76
Rearing (frequência)	19,64 $\pm$ 1,97	28,09 $\pm$ 2,96	23,73 $\pm$ 3,05	20,00 $\pm$ 2,00	16,75 $\pm$ 3,09
Tempo (s) de Imobilidade	209,62 $\pm$ 4,90	235,29 $\pm$ 15,66	226,10 $\pm$ 6,22	230,10 $\pm$ 8,46	218,25 $\pm$ 10,18
Grooming	2,73 $\pm$ 0,74	0,54 $\pm$ 0,25**	1,45 $\pm$ 0,39	0,83 $\pm$ 0,37	1,00 $\pm$ 0,71
Bolos fecais (quantidade)	2,73 $\pm$ 0,80	2,91 $\pm$ 0,70	1,45 $\pm$ 0,53	3,00 $\pm$ 0,56	3,25 $\pm$ 1,25

\* ( $P < 0,05$ ) \*\* ( $P < 0,01$ ) em relação ao grupo controle (CN). ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

### Comportamento sexual

O tratamento de mães com 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA conduziu, nos filhotes, ao maior número de montas incompletas, ao maior número de montas incompletas e intromissões até a primeira ejaculação, ao maior número de montas incompletas e intromissões nos primeiros 30 minutos e à diminuição da eficiência copulatória ( $P < 0,01$ ) (Tabela 7).

Tabela 7. Parâmetros do comportamento sexual de machos expostos via útero e lactação ao Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE). Os dados são média  $\pm$  EPM. ( $n= 15$  /grupo)

Parâmetros	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Latência para 1 <sup>a</sup> monta (min)	1,04 $\pm$ 0,37	1,06 $\pm$ 0,15	0,99 $\pm$ 0,35	0,73 $\pm$ 0,21	1,07 $\pm$ 0,16
Latência para 1 <sup>a</sup> intromissão (min)	1,78 $\pm$ 0,75	1,04 $\pm$ 0,25	1,83 $\pm$ 0,53	1,33 $\pm$ 0,22	1,23 $\pm$ 0,94
Latência para 1 <sup>a</sup> ejaculação (min)	13,37 $\pm$ 1,85	15,40 $\pm$ 1,81	14,45 $\pm$ 2,41	14,84 $\pm$ 1,82	14,18 $\pm$ 1,54

Continua

Continuação

Parâmetros	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Nº de montas incompletas até a 1ª ejaculação	3,00 ± 0,82	25,33 ± 6,32**	7,86 ± 1,92	5,83 ± 1,82	6,50 ± 0,50
Total de montas incompletas e intromissões até a 1ª ejaculação	20,67 ± 2,20	49,67 ± 7,13**	31,00 ± 4,44	28,67 ± 3,95	31,00 ± 1,00
Total de montas incompletas e intromissões nos 30 min.	38,33 ± 4,90	77,83 ± 10,26**	49,71 ± 5,40	50,00 ± 3,99	44,50 ± 2,50
Latência para a 1ª intromissão após a 1ª ejaculação (min.)	4,74 ± 0,22	3,92 ± 0,32	3,96 ± 0,14	4,21 ± 0,62	3,88 ± 0,96
Nº de ejaculações	2,17 ± 0,31	1,55 ± 0,22	2,17 ± 0,40	2,00 ± 0,37	1,80 ± 0,20
Eficiência copulatória (%)	85,40 ± 3,96	48,56 ± 8,31**	73,04 ± 6,66	81,02 ± 4,94	84,11 ± 4,61
Índice de atividade sexual	13,48 ± 0,75	15,72 ± 0,62	14,65 ± 0,53	14,53 ± 0,43	15,27 ± 0,69

\*\*  $P < 0,01$  qui-quadrado ou ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

#### 4. DISCUSSÃO

Os principais constituintes do *Rosmarinus officinalis* L., como os monoterpenos, diterpenos, flavonoides, constituintes fenólicos e suas interações, são os principais responsáveis pelas numerosas atividades biológicas já descritas para essa planta (HANSON, 2016). Neste estudo, os compostos encontrados para o óleo essencial e suas porcentagens foram, respectivamente, o 1,8 cineol – 44,85%, a cânfora – 17,21%, alfa-pineno – 13,83% e beta-pineno – 10,70%, confirmando a prevalência de monoterpenos, assim como para Okoh et al. (2010). A fração do 1,8 cineol no *Rosmarinus officinalis* pode variar entre 12 e 47% (VICENZI et al., 2002). Muitas propriedades terapêuticas são atribuídas a este monoterpeno, e em particular podem ser citados o seu uso em doenças respiratórias (JUERGENS et al., 2003) e mais recentemente, na neuroproteção (MANNELLI et al., 2016). Os constituintes do óleo de alecrim utilizado neste estudo apresentaram composição muito semelhante ao óleo adquirido pelo mesmo fornecedor, em estudo anterior como promissor para o tratamento da esporotricose (WALLER et al., 2016).

Exposições tóxicas pré-natais e perinatais têm sido associadas a efeitos que podem se desenvolver na prole (BRUIN et al., 2010), destacando-se por exemplo,



alterações comportamentais causadas pela exposição ao bisfenol A (BOUDALIA et al., 2014), alteração hormonal e comportamental em ratos Wistar machos causadas pela exposição ao glifosato (ROMANO et al., 2012). Dessa forma, o foco deste estudo foi verificar os efeitos do óleo essencial de alecrim e do 1,8 cineol, seu composto majoritário, no desenvolvimento geral e reprodutivo da prole exposta durante o período peri e pós-natal (lactação).

Nosso estudo demonstrou que a exposição gestacional e lactacional ao composto majoritário do OEA afetou tanto a produção de testosterona quanto o número de espermatozoides nos ratos descendentes. A exposição da progênie ao 1,8 cineol compreendeu um período crítico da organização das ações de hormônios gonadais na diferenciação sexual no cérebro e consequente definição do sexo gonadal (MACLUSKY et al., 1981). A produção espermática apresenta relação direta com os eventos decorridos durante o período crítico de desenvolvimento testicular em ratos e mudanças experimentais durante este período podem alterá-la (ORTH et. al., 1988). Apesar do valor da produção diária de espermatozoides neste grupo não apresentar significância estatística, ele está claramente elevado quando comparado aos outros grupos estudados. Nas demais características de desenvolvimento sexual dos machos, descida dos testículos e separação prepucial, não foram encontradas diferenças entre os grupos tratados e o grupo controle, demonstrando que não houve interferência na idade à puberdade dos machos.

Em nossos estudos a dose de 1,8 cineol utilizada ( $134,55 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) é a mesma do monoterpeno na solução de maior ( $1.200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) concentração de óleo essencial estudada (C12) e para os animais desse grupo não houve diferença com CN, indicando que a interação do 1,8 cineol com os outros compostos do óleo essencial não apresenta o mesmo efeito do monoterpeno sozinho. Este resultado corrobora com Bakkali et al. (2008) que relata ser questionável que o/os principais compostos de um óleo reflitam as características biológicas do mesmo, pois a ação sinérgica de várias moléculas contidas em um óleo essencial podem ser diferentes da ação de um ou dois componentes principais isolados.

Os dados sobre a toxicidade do 1,8 cineol são muito limitados (VICENZI et al., 2002), e não foram encontrados estudos avaliando a ação desta substância sobre descendentes expostos durante o período gestacional e lactacional. Caldas et al. (2016) relatam que em ensaio pré-clínico de ratos adultos, machos e fêmeas, com doses repetidas de 1,8 cineol, as alterações encontradas são ocasionais e sem relevância

clínica, porém, sugerem possível toxicidade materna e fetal, recomendando que mais investigações sejam feitas (DÖRSAM et al., 2015).

Já o óleo essencial de alecrim, é referido na literatura como antigonadotrófico em ratos (FARNSWORTH, 1975) e os hormônios gonadotróficos, LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio folículo estimulante), atuam nos testículos para a produção de testosterona e espermatozoides (HEINDEL; TREINEN, 1989), porém não foram observadas alterações nas concentrações séricas de testosterona e no número e produção de espermatozoides nos animais tratados com o óleo, nas concentrações estudadas.

A avaliação do peso dos animais é utilizada como parâmetro para indicar o estado de saúde e desenvolvimento, bem como, pode fornecer informação importante sobre a toxicidade (HOLLENBACH et al.; 2015). A análise dos pesos dos animais não revelou diferenças entre os grupos estudados, sugerindo que o óleo e seu composto majoritário não causaram toxicidade sistêmica nos animais expostos.

Não foram encontradas alterações significativas na evolução da massa corporal, no desenvolvimento geral e na abertura do canal vaginal da prole em nenhum dos grupos testados, bem como para o peso dos órgãos. Xu et al. (2014) descreve alterações histopatológicas no fígado e rim de animais tratados com 21,38 mg.kg<sup>-1</sup>, 64,15 mg.kg<sup>-1</sup> e 192,45 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol indicando que estes órgãos foram os alvos da toxicidade desta substância, porém, não foram encontradas alterações nos pesos absoluto e relativo. O 1,8 cineol não é capaz de atravessar a barreira sangue/leite em quantidades suficientes para afetar as enzimas microssomais da prole, no entanto, atravessa facilmente a barreira transplacentária e foi capaz de alterar as enzimas hepáticas após uma dose de 500 mg.kg<sup>-1</sup> (VICENZI et al.; 2002). A dose utilizada em nossa pesquisa foi de 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>, e não foram observadas alterações histopatológicas no fígado.

Com relação ao desenvolvimento pós-natal, os reflexos de endireitamento em superfície e geotaxia negativa foram alterados nos grupos expostos às doses de 600 mg.kg<sup>-1</sup> (C6) e 1.200 mg.kg<sup>-1</sup> (C12) de OEA. No PPD2, C6 e C12 demoraram mais tempo para retornarem ao decúbito ventral; no grupo C6, isto também ocorreu no PPD4. Já para a geotaxia negativa, tanto os animais do grupo C6 quanto os do C12 orientaram-se em menos tempo quando comparados ao grupo CN. A exposição maternal à xenobióticos durante a gestação e lactação podem causar neurotoxicidade no desenvolvimento e/ou anormalidades comportamentais nos descendentes (CASTRO & PALERMO-NETO, 1988; CASTRO et al., 1992). Segundo os mesmos autores, as

avaliações comportamentais são capazes de demonstrar, até mesmo na vida adulta do animal, se a exposição maternal causou alterações no sistema nervoso.

Outra possível evidência da interferência do óleo no sistema nervoso da prole são os resultados do teste de campo aberto e comportamento sexual. Com relação ao comportamento materno, não houve alteração para nenhum grupo estudado, demonstrando ausência de toxicidade materna, já que este teste é um dos indicadores deste efeito sugerindo que a interferência ocorreu apenas na progênie não havendo influência do comportamento da mãe (VILELA, et al., 2011; VILELA et al., 2014; SANTOS et al., 2015).

No campo aberto, o grupo C3 apresentou maior frequência de entrada no centro e menor quantidade de autolimpezas, o que pode ser indicativo de atividade ansiolítica do alecrim, (KUMAR et al., 2013; FERLEMI, et al., 2015; ABADI et al., 2016). Quando os animais são colocados em um ambiente novo, expressam sua ansiedade e medo diminuindo a ambulação e exploração (BHATTACHARYA et al.; 1997). Resultados semelhantes foram observados por Kumar et al. (2013) tanto para o extrato de *Rosmarinus officinalis* quanto para o ácido carnósico, extraído do alecrim. O extrato hidroalcoólico do alecrim, pesquisado nas doses de 100, 200 e 400 mg.kg<sup>-1</sup> demonstrou efeitos ansiolíticos especialmente nas doses mais altas, porém, na avaliação da atividade locomotora no teste de labirinto em cruz, apesar de valores não significativos estatisticamente, os animais apresentaram maior atividade nas primeiras duas doses e redução da locomoção na dose mais alta (400 mg.kg<sup>-1</sup>) (ABADI et al., 2016) indicando que a resposta pode não ser proporcional ao aumento da dose, assim como demonstrado em nosso estudo.

A presença de outros compostos na planta, como a luteolina, o ácido fenólico, diterpenos, triterpenos, taninos e resinas pode aumentar o efeito sobre o sistema nervoso central (ABADI et al.; 2016), porém, essa diversidade também torna os extratos quimicamente complexos, com alvos e mecanismos de ação muito diversificados (FERLEMI, et al.; 2015).

O teste de comportamento sexual é realizado a fim de avaliar a atividade sexual de machos com fêmeas receptivas durante um tempo determinado (AGMO et al.; 1987). Houve aumento do número de montas incompletas no grupo C3, o que levou à diminuição da eficiência copulatória, ou seja, foi necessário maior número de montas para ocorrer ejaculação. O aumento do número de montas e intromissões antes da ejaculação pode aumentar o número de espermatozoides no ejaculado e facilitar o

transporte na fêmea, aumentando a fertilidade (HULL et al., 2006). No entanto, este resultado não foi acompanhado de alterações nos tempos de latência, número de ejaculações e índice de atividade sexual, capaz de modificar as taxas reprodutivas.

Este estudo mostra, pela primeira vez, os efeitos do óleo essencial de alecrim e seu composto majoritário, o 1,8 cineol, no desenvolvimento geral e sexual dos descendentes expostos durante os períodos peri e pós-natal. Concluímos que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. não afeta indicadores reprodutivos de animais da F1 de machos e fêmeas tratados durante os períodos gestacional e lactacional nas doses testadas. Na avaliação do desenvolvimento pós-natal, ocorre modificação no tempo de aparecimento dos reflexos de endireitamento e geotaxia negativa. Concluímos ainda que o 1,8 cineol na dose de 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> altera parâmetros reprodutivos de machos como aumento sérico de testosterona e aumento do número de espermatozoides, o que pode indicar a necessidade da ampliação das doses do OEA e do composto majoritário, com vistas à verificação de relação dose/efeito sobre os parâmetros reprodutivos.

## REFERÊNCIAS

ABADI, M.N.A.; MORTAZAVI, M.; KALANI, N.; MARZOUNI, H.Z.; KOOTI, W.; ALI-AKBARI, S. Effect of hidroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. leaf on anxiety in mice. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**. v.21, n.4, p.85-90, 2016.

AGMO, A.; PAREDES, R.; FERNÁNDES, H. Differential effects of GABA transaminase inhibitors on sexual behavior, locomotor activity and motor execution in male rat. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. v. 28, p. 3345-3347, 1987.

ARRATI, P.; CARMONA, C.; DOMINGUEZ, G.; BEYER, C.; ROSEMBLATT, J. GABA receptor agonists in the medial preoptic área and maternal behavior in lactating rats. **Physiology and Behavior**. v. 87, p. 51-65, 2006.

ASANO, Y. Characteristics of open field behavior of Wistar and Sprague-Dawley rats. **Experimental Animals**. v.35, n.4, p. 505-508, 1986.

BAKIREL, T. et al. In vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) in alloxan-diabetic rabbits. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 116, p.64-73, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, p.446-475, 2008.

BAN, L.; NARASIMHAMOORTHY, B.; ZHAO, L.; GREAVES, J.A.; SCHROEDER, W.D. Antioxidant activities from different rosemary clonal lines. **Food Chemistry**. v. 201, p.259-263, 2016.

BHATTACHARYA, S.K.; SATYAN, K.S. Experimental methods for evaluation of psychotropic agents in rodents: I-Anti-anxiety agents. **Indian J Exp Biol**. v.35, p. 565-575, 1997.

BOUDALIA, S.; BERGES, R.; CHABANET, C.; FOLIA, M.; DECOCQ, L.; PASQUIS, B.; ABDENNEBI-NAJAR, L.; CANIVENC-LAVIER, M. A multi-generational study on low-dose BPA exposure in Wistar rats: Effects on maternal behavior, flavor intake and development. **Neurotoxicology and Teratology**. v. 41, p. 16-26, 2014.

BRUIN, J.E.; GERSTEIN, H.C.; HOLLOWAY, A.C. Long-term consequences of fetal and neonatal nicotine exposure: a critical review. **Toxicol. Sci**. v. 116, n.2, p. 364-374, 2010.

BURFIELD, T. Safety of essential oils. **The International Journal of Aromatherapy**. v.10, n.1, 14p. 2000.

CALDAS, G.R.F.; LIMEIRA, M.M.F.; ARAÚJO, A.V.; ALBUQUERQUE, G.S.; SILVA-NETO, J.C.; SILVA, T.G.; COSTA-SILVA, J.H.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; WANDERLEY, A.G. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 96, p. 297-306, 2016.

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

CASTRO, V. L.; CHIORATO, S.; PINTO, N. Relevance of developmental testing of exposure to methamidophos during gestation to its toxicology evaluation. **Toxicology Letters**. v. 111, n. 1-2, p. 93-102, 2000.

CASTRO, V.L.; BERNARDI, M.M.; PALERO-NETO, J. Evaluation of prenatal aldrin intoxication in rats. **Archives of Toxicology**. v.66, p.149-152, 1992.

CASTRO, V.L.; PALERMO-NETO, J. Alterations in the behavior of young and adult rats exposed to aldrin during lactation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.21, p. 987-990, 1988.

CHAMPAGNE, F.; FRANCIS, D.; MAR, A.; MEANEY, M. Variations in maternal care in the rat as a mediating influence for the effects on environment on development. **Physiology and Behavior**. v. 79, p. 359-371, 2003.

CHIAVEGATTO, S.; BERNARDI, M.M.; DE-SOUZA-SPINOSA, H. Effects of prenatal diphenhydramine administration on sexual behavior of rats. **Braz J Med Biol Res**. v. 22, p.729-732, 1989.

COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 44, p. 87-110, 2004.

COSTA, P.A.; POLI, J.H.Z.; SPEROTTO, N.D.M.; MOURA, D.J.; SAFFI, J.; NIN, M.S.; BARROS, H.M.T. Brain DNA damage and behavioral changes after repeated intermittent acute ethanol withdrawal by young rats. **Psychopharmacology**. v. 232, p. 3623-3636, 2015.

DÖRSAM, B.; WU, C.; EFFERTH, T.; KAINA, B.; FAHRER, J. The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. **Arch. Toxicology**. v.89, p. 797-805, 2015.

EL-DIN, R.A.S.; EL-SHAHAT, A.E. & ELMANSY, R.A. An electron microscopic study of the antifertility potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in male albino rats. **Int. J. Morphol.** v.30, n.2, p.666-672, 2012.

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

FARNSWORTH, N.R.; BINGEL, A.S.; CORDELL, G.A.; CRANE, F.A.; FONG, H.H.S. Potential value of plants as sources of new antifertility agents I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.64, n.4, p.535-598, 1975.

FELICIO, L.F; PALERMO-NETO,J.; NASELLO, A.G. Perinatal bromopride treatment: effects on sexual behavior of male and female rats. **Behav Natural Biol**. v. 52, p.145-151, 1989.

FERLEMI, A.; KATSIKOUDI, A.; KONTOGIANNI, V.G.; KELLICI, T.F.; IATROU, G.; LAMARI, F.N.; TZAKOS, A.G.; MARGARITY, M. Rosemary tea consumption results to anxiolytic-and anti-depressant-like behavior of adult male mice and inhibits all cerebral area and liver cholinesterase activity; phytochemical investigation and in silico studies. **Chemico-Biological Interactions**. v. 237, p. 47-57, 2015.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**. v. 102, p. 898-904, 2007.

HANSON, J.R. Rosemary, the beneficial chemistry of a garden herb. **Science Progress**. v.99, n.1, p. 83-91, 2016.

HEINDEL, J.J.; TREINEN, K.A. Physiology of the male reproductive system: endocrine, paracrine and autocrine regulation. *Toxicologic Pathology*, v.17, n.2, p.411-445, 1989.

HOLLENBACH, C.B.; BING, R.S.; STEDILE, R.; MELLO, F.B.S.; SCHUCH, T.L.; RODRIGUES, M.R.A.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.43, p. 1295-1301, 2015.

HULL, E.M.; WOOD, R.I.; McKENNA, Neurobiology of Male Sexual Behavior. In: KNOBIL, E.; NEILL, J.D. (eds.) *Physiology of Reproduction*, 3ed. Elsevier, Nova York, p. 1759-60, 2006.

IRKIN, R.; ABAY,S.; AYDIN,F. Inhibitory effects of some plant essential oil against *Arcobacter butzleri* and potential for rosmary oil as a natural food preservative. **Journal of Medicinal Food**. v.14, n.3, p.291-296, 2011.

JUERGENS, U.R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Anti-inflammatory activity of 1,8 cineole (eucalyptol) in bronchial asthma: a double blind placebo-controlled. **Trial. Respir. Med**. v. 97, p. 250-256, 2003.

KORENBROT, C.C.; HUHTANIEMI, I.T.; WEINER, R.I. Preputial separation as an external sign of pubertal development in the male rat. **Biol Reprod**. v.17, p.298-303, 1977.

KOVAR, K.A.; GROPPER, B.; FRIESS, D.; AMMON, H.P.T. Blood levels of 1,8-cineole and locomotor activity of mice after inhalation and oral administration of Rosemary Oil. **Planta Med**. v.53, p.315-318, 1987.

KUMAR, A.; AGARWAL, P.; SHAKYA, A.; THAKUR, A.K.; KUMAR, V. Key role of carnosic acid in the anxiolytic-like activity of *Rosmarinus officinalis* Linn. **J Pharmacol Clin Toxicol**. v. 1, n. 2, 1013p, 2013.

LEMONICA, I.P., DAMASCENO, D.C., DI-STASI L.C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 29, n. 2, p. 223-227, 1996.

MACLUSKY, N.J.; NAFTOLIN, F. Sexual differentiation of the central nervous system. **Science**. v. 211, p. 1294-1302, 1981.

MANNELLI, L.D.C.; MICHELI, L.; MARESCA, M.; CRAVOTTO, G.; BELLUMORI, M.; INNOCENTI, M.; MULINACCI, M.; GHELARDINI, C. Anti-neuropathic effects of *Rosmarinus officinalis* L. terpenoid fraction: relevance of nicotinic receptors. **Scientific Reports**. v. 6: 34832, 2016.

NUSIER, M.K., BATAINEH, H.N., DARADKAH, H.M. Adverse effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rat. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 809-213, 2007.

OECD Guideline for the Testing of Chemicals 416, **Two Generation Reproduction Toxicity Study**, 2001.

OKOH, O.O. et al; SADIMENCO, A.P.; AFOLAYAN A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**. v.120, p. 308-312, 2010.

ORTH, J.M.; GUNSALUS, G.L.; LAMPERTI, A.A. Evidence from Sertoli-cell depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*, v. 122, p. 787-794, 1988.

PEREIRA, M.; FERREIRA, A. Demanding pups improve maternal behavior impairments in sensitized and haloperidol-treated lactating female rats. **Behavioural Brain Research**. v. 175, p. 139-148, 2006.

PIFFER, R.C.; GARCIA, P.C.; GERARDIN, D.C.; KEMPINAS, W.G.; PEREIRA, O.C. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reprod. Fertil. Dev.** v.21, p.634-639, 2009.

RICE, D.; BARONE JÚNIOR., S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives Supplements**, Triangle, v. 108, S3, p. 511-533, 2000.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adults rats. **J. Reprod. Fert.** v.54, p. 103-107, 1978.

ROMANO, M.A.; ROMANO, R.M.; SANTOS, L.D.; WISNIEWSKI, P., CAMPOS, D.A.; SOUZA, P.B.; VIAU, P.; BERNARDI, M.M.; NUNES, M.T.; OLIVEIRA, C.A. Glyphosate impairs male offspring reproductive development by disrupting gonadotropin expression. **Reproductive Toxicology**. v.86, n.4, p. 663-673, 2012.

SÁ, R.C.S., LEITE, M.N., OLIVEIRA, L.G. et al. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male Wistar rats' organs and reproductive system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 n. 3, p. 324-332, 2006.

SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104f. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS.

SANTOS, A.H.; RAMOS, A.C.; SILVEIRA, K.M.; KISS, A.C.I.; LONGHINI, R.; DINIZ, A; MELLO, J.C.P.; GERARDIN, DCC. The exposure to *Trichilia catigua* (cauaba) crude extract impairs fertility of adult female rats but does not cause reproductive damage to male offspring. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 166, p. 86-91, 2015.

SASAKI, K.; OMRI, A.E.; KONDO, S.; HANA, J.; ISODA, H. *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**. v. 238, p. 86-94, 2013.

SIENKIEWICZ, M. et al. The potential of use basil and rosemary essential oils as effective antibacterial agents. **Molecules**. v.18, p.9334-9351, 2013.

SOUZA, F.L.; LAZZARI, V.; AZEVEDO, M.S.; ALMEIDA, S.; SANVITTO, G.L.; LUCION, A.B.; GIOVENARDI, M. Progesterone and maternal aggressive behavior in rats. **Behavioural Brain Research**. v. 212, p. 84-89, 2010.



SOUZA, M.A.; SZAWKA, R.E.; CENTENARO, L.A.; DIEHL, L.A.; LUCION, A.B. Prenatal stress produces sex differences in nest odor preference. **Physiology & Behavior**. v. 105, p. 850-855, 2012.

ULBRICHT, C.; ABRAMS, T.R.; BRIGHAM, A.; CEURVELS, J.; CLUBB, J.; CURTISS, W.; KIRKWOOD, C.D.; GIESE, N.; HOEHLN, K.; IOVIN, R.; RUSIE, R.I.E.; SERRANO, J.M.G.; WEISSNER, W. An evidence-based systematic review of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal Diet Suppl.** v. 7, p.351-413, 2010.

VICENZI, M; SILANO, M.; VICENZI, A.; MAIALETTI, F; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: eucalyptol. **Fitoterapia**. v. 73, p. 269-275, 2002.

VILELA, F.C.; GIUSTI-PAIVA, A. Cannabinoid receptor agonist disrupts behavioral and neuroendocrine responses during lactation. **Behavior Brain Research**. v. 263, p. 190-197, 2014.

VILELA, F.C.; GIUSTI-PAIVA, A. Glucocorticoids disrupt neuroendocrine and behavioral responses during lactation. **Endocrinology**. v. 152, n. 12, p. 4838-4845, 2011.

WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; SILVA, A.L.; CASTRO, L.L.D.; CLEFF, M.B.; FERRAZ, V.; MEIRELES, M.C.; ZANETTE, R.; MELLO, J.R. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oil of Lamiaceae family. **Mycopathologia**. v. 181, p. 857-863, 2016.

XU, J.; HU, Z.; WANG, C.; YIN, Z.; WEI, Q.; ZHOU, L.; LIL,.; DU, Y.; JIA, R.; LI, M.; FAN, Q.; LIANG, X.; HE, C.; YIN, L. Acute and subacute toxicity study of 1,8-cineole in mice. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.** v.7, n.4, p.1495-1501, 2014.

## *CAPÍTULO IV*

### ARTIGO 2

#### **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* E 1,8 CINEOL NA REPRODUÇÃO USANDO TESTES DE FERTILIDADE EM RATOS WISTAR.**

#### **EVALUATION OF EFFECTS OF *Rosmarinus officinalis* ESSENTIAL OIL AND 1,8 CINEOLE ON REPRODUCTION USING THE FERTILITY TEST IN WISTAR RATS.**

Luciana Dalazen dos Santos<sup>a\*</sup>, Luiz Carlos Klein-Júnior<sup>c</sup>, Andrea dos Santos Dantas<sup>a</sup>, David Driemeier<sup>a,d</sup>, Laís Hartmann Jardim<sup>b</sup>, Amanda Santos Sartori<sup>b</sup>, Fernanda Bastos de Mello<sup>b</sup>, João Roberto Braga de Mello<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica – Farmacologia e Toxicologia Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>d</sup> Laboratório de Patologia Veterinária, Faculdade de Veterinária, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

\* Autor para correspondência: Luciana Dalazen dos Santos; Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil; lu\_dalazen@hotmail.com

**RESUMO** - Tendo em vista as diversas propriedades do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, a planta torna-se promissora para o desenvolvimento de novos fármacos, mas para tanto, testes de toxicidade reprodutiva são exigidos. Esse estudo avalia os efeitos do OEA no sistema reprodutivo de ratos *Wistar* machos e fêmeas e avaliou os efeitos da exposição crônica. Ratos machos e fêmeas com 90 dias de idade foram divididos em cinco grupos experimentais: CN (controle negativo – Tween 80), C3 (OEA 300 mg.kg<sup>-1</sup>), C6 (OEA 600 mg.kg<sup>-1</sup>), C12 (OEA 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e CE (1,8 cineol 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>), tratados diariamente, via sonda orogástrica. Os machos foram tratados 70 dias antes e durante o acasalamento, e as fêmeas, 14 dias antes do acasalamento e nos 21 dias de acasalamento, gestação e lactação. Os animais foram acasalados em uma proporção de 3 fêmeas para cada macho. Os parâmetros avaliados foram: peso e histologia dos órgãos, consumo de ração e água e parâmetros reprodutivos (machos: morfometria do epitélio seminífero, dosagem sérica de testosterona, contagem espermática e avaliação das características morfológicas dos espermatozoides; fêmeas: nº de fêmeas copuladas, nº de fêmeas com diagnóstico de gestação positivo, nº de fêmeas gestantes, nº de filhotes nascidos vivos, nº de filhotes nascidos, nº de fêmeas copuladas que gestaram, nº de filhotes por ninhada, massa corporal dos filhotes ao nascimento, proporção de machos e fêmeas nascidos e taxas reprodutivas). Houve

redução no número de fetos por ninhada (8,3) no grupo CE e aumento da massa corporal (7,1g) dos mesmos, sugerindo embriofetividade. Os animais não apresentaram sinais de toxicidade sistêmica. Os machos apresentaram aumento do peso relativo do fígado nas duas maiores doses testadas (C6 e C12) e diminuição no peso do testículo e epidídimo, sem outras alterações de parâmetros reprodutivos. As fêmeas do grupo C12 também tiveram aumento do peso relativo do fígado e aumento no consumo de água.

**Palavras chave:** Óleo essencial. *Rosmarinus officinalis*. 1,8-cineol. Toxicidade reprodutiva.

**ABSTRACT** - *In view of the various properties of Rosmarinus officinalis essential oil, the plant becomes promising for the development of new drugs, but for that, reproductive toxicity tests are required. This study evaluates the effects of REO on the reproductive system of male and female Wistar rats and evaluated the effects of chronic exposure. Male and female rats with 90 days of age were divided into five experimental groups: NC (negative control - Tween 80), C3 (REO 300 mg.kg<sup>-1</sup>), C6 (REO 600 mg.kg<sup>-1</sup>), C12 (REO 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e CE (1,8 cineol 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>), treated daily, via orogastric tube. Males were treated 70 days before and during mating, and females, 14 days before mating and during 21 days of mating, gestation and lactation. The animals were mated at a ratio of 3 females to each males. The parameters evaluated were: body weight and histology, feed and water consumption, and reproductive parameters (males: seminiferous epithelial morphometry, serum testosterone, sperm count and evaluation of sperm morphological characteristics; females: number of copulated females, number of females diagnosed with positive gestation, number of pregnant females, number of live-born pups, number of pups born, number of mated females, number of pups per litter, pups' body mass at birth, proportion of males and females born and reproductive rates). There was reduction in the number of fetuses per litter (8,3) and increased body mass (7,1g), suggesting embryofetivity. The animals showed no signs of systemic toxicity. The males presented increase of the relative weight of the liver in the two highest doses tested (C6 and C12) and decrease in the weight of the testis and epididymis, without other changes of reproductive parameters. The females of the C12 group also had an increase in the relative weight of the liver and an increase in water consumption.*

**Key words:** Essential oil. *Rosmarinus officinalis*. 1,8 cineole. Reproductive toxicity

## 1. INTRODUÇÃO

Muitos autores estudam o óleo essencial de alecrim (OEA) (*Rosmarinus officinalis* L.) baseados nas suas propriedades funcionais, principalmente pelas atividades ansiolítica e antidepressiva (SASAKI et al., 2013; FERLEMI et al., 2015; ABADI et al., 2016), antioxidante (BAN et al.; 2016), antimicrobiana (HUSSAIN et al., 2010; OKOH et al., 2010; CLEFF et al., 2012; WANG et al., 2012) e mais

recentemente, nosso grupo relatou promissora utilização para o tratamento da esporotricose (WALLER et al., 2016).

Os testes de toxicidade reprodutiva são realizados durante a fase de estudos clínicos e são pré-requisito para a aprovação de novas substâncias. Os principais protocolos são emitidos pela Europa através da *Organization for Economic Co-operation and Development* (OECD) e pelos Estados Unidos da América através da *Food and Drug Administration* (FDA) (ANDRADE et al., 2016). O OEA foi associado a alterações na gestação e sobre o sistema reprodutor, não sendo recomendado o seu uso por via oral, retal ou vaginal durante o período gestacional (DWECK, 2009), Veiga Junior e Pinto (2005) alertam que o risco maior está relacionado ao aumento da motilidade uterina causando aborto, ou ainda, que ele inibe a implantação do blastocisto (LEMONICA et al, 1996) e reduz a atividade estrogênica em ratas (ZUH et al, 1998). El-din et al. (2012) caracterizaram o óleo como um potencial causador de infertilidade em ratos machos e ressaltaram a importância de isolar o componente responsável, bem como elucidar o seu mecanismo de ação.

Apesar dos vários relatos das propriedades biológicas dessa planta, não existem estudos suficientes para caracterizar o perfil de segurança da administração oral do óleo essencial de alecrim, portanto, o objetivo deste estudo foi contribuir com as informações já disponíveis sobre os efeitos deste óleo no sistema reprodutivo de ratos *Wistar* machos e fêmeas e avaliar os efeitos da exposição crônica.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

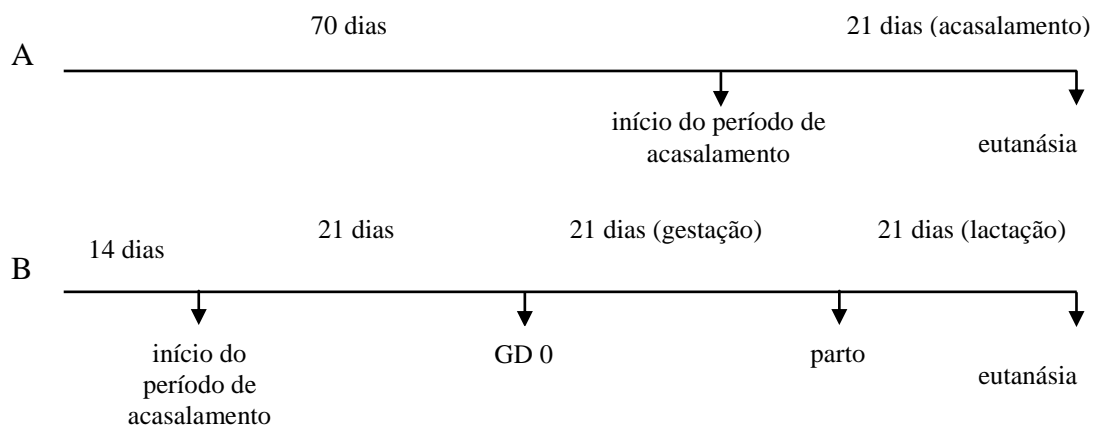
### **Insumos**

Foi utilizado óleo essencial de alecrim comercial, adquirido da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil), com certificação de qualidade. A análise qualitativa e quantitativa do óleo foi realizada no laboratório do Instituto de Química da UFRGS, Porto Alegre/RS, por cromatografia gasosa com detector de massas, injetor split/splitless, GC/MS Shimadzu QP-5050A. Fazem parte dos produtos adicionais obtidos para o estudo, o 1,8-cineol (Sigma, Solon, OH, USA) e kits de testosterona total (IBL International GmbH, Hamburg, Germany).

### Animais, protocolo experimental e tratamentos

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS, Porto Alegre, RS, número 26988.

Foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas, com idade inicial de 90 dias provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório da UFRGS (CREAL). Os animais foram mantidos em condições constantes de umidade ( $50\% \pm 5$ ), temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), ciclo de luz claro/escuro de 12h e alimentados com ração comercial (Nuvital CR 1, Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum*. Os consumos de ração e água foram mensurados diária e individualmente, para machos nos 70 dias antes do acasalamento, e para fêmeas nos 14 dias pré-acasalamento e no período gestacional e posteriormente transformados em consumos relativos ao peso corporal do animal [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100]. O OEA e o 1,8-cineol foram diluídos em Tween e administrados aos animais uma vez ao dia, via oral (gavagem) em um volume de 1mL/100g de peso corporal. Machos foram tratados 70 dias antes e durante o acasalamento e as fêmeas 14 dias antes do acasalamento e nos 21 dias de acasalamento, gestação e lactação. O desenho experimental está apresentado na Figura 1.



**Figura 1.** Desenho experimental. Os machos (A) foram tratados 70 dias antes e 21 dias durante o acasalamento e ao final deste período, foram eutanasiados. As fêmeas (B) foram tratadas 14 dias antes do acasalamento, 21 dias durante o acasalamento, gestação e lactação e eutanasiadas ao final desse período. GD 0 (Dia 0 da gestação).

As doses do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* foram estabelecidas de acordo com estudos prévios de atividade antimicrobiana *in vitro* realizados por Santin (2013). Os animais foram divididos aleatoriamente, em cinco grupos experimentais:

*Grupo I* – Controle negativo, fêmeas e machos tratados com o veículo da preparação da solução de tratamento, Tween 80 (3%).

*Grupo II* – Composto majoritário ( $134,55 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas e machos tratados com solução de 1,8 cineol na concentração 44,85% (proporcional à quantidade do composto na solução de óleo essencial 12%).

*Grupo III* – Dose 1 ( $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas e machos tratados com óleo essencial de alecrim 3% em emulsão contendo Tween 3%.

*Grupo IV* – Dose 2 ( $600 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas e machos tratados com óleo essencial 6% em emulsão contendo Tween 3%.

*Grupo V* – Dose 3 ( $1.200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas e machos tratados com óleo essencial 12% em emulsão contendo Tween 3%.

#### Acasalamento

O acasalamento foi realizado em três ciclos de cinco dias consecutivos, com intervalo de 2 dias entre ciclos, em uma proporção de três fêmeas para cada macho. O início da gestação (GD0) foi constatado através de esfregaço vaginal contendo espermatozoides.

#### Peso e histologia dos órgãos

Dos machos e fêmeas, no dia da eutanásia: rins, fígado, baço e coração. Procedeu-se avaliação em relação a possíveis alterações macroscópicas e então a massa de cada órgão foi mensurada e relacionada com a massa corporal do indivíduo. Dos órgãos sexuais masculinos, passaram pelo mesmo procedimento: testículos, epidídimos, ductos deferentes, próstata e vesícula seminal, esta última foi drenada antes da pesagem. Dos órgãos sexuais femininos, passaram também pelo procedimento acima descrito os ovários e o útero. Todos os órgãos, exceto um testículo por animal, foram fixados em solução de formalina tamponada. Um testículo por grupo foi fixado em solução de Bouin, tratado com álcool, embebido em parafina e cortes de  $5\mu\text{m}$  foram preparados em lâminas e corados com hematoxilina eosina. Todos os órgãos foram examinados no Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

### Parâmetros reprodutivos

Os indicadores reprodutivos avaliados nos machos foram: morfometria do epitélio seminífero, dosagem sérica de testosterona, contagem espermática e avaliação das características morfológicas dos espermatozoides. Nas fêmeas: n° de fêmeas copuladas, n° de fêmeas com diagnóstico de gestação positivo, n° de fêmeas gestantes, n° de filhotes nascidos vivos, n° de filhotes nascidos, n° de fêmeas copuladas que gestaram, n° de filhotes por ninhada, massa corporal dos filhotes ao nascimento e proporção de machos e fêmeas nascidos, com esses dados foram calculadas as taxas reprodutivas.

### Dosagem de testosterona total

No dia da eutanásia, os machos foram anestesiados e submetidos à celiotomia. As coletas de amostras sanguíneas foram obtidas a partir de venopunção da veia cava caudal sob visualização direta e o soro, então acondicionado em microtubo e armazenado a -20°C. A testosterona foi mensurada por radioimunoensaio (ELISA, Bio-Tek Instruments ELX800, USA) usando kits comerciais para testosterona total (IBL International GmbH, Hamburg, Germany).

### Avaliação espermática

As contagens espermáticas foram realizadas de acordo com o que foi previamente descrito por Piffer et al. (2009) e Robb et al. (1978). Os testículos e epidídimos foram pesados, a túnica albugínea removida e o parênquima homogeneizado em 5mL de solução salina contendo Triton 0,5%, seguindo a sonicação por 30s. As amostras foram diluídas 10 vezes em solução salina e as espermátides maduras resistentes foram contadas nos quatro quadrantes laterais do hemocitômetro. Os valores foram subsequentemente divididos por 6,1 dias para calcular a produção diária de espermatozoides. A cauda do epidídimo foi cortada, homogeneizada e diluída como o descrito para os testículos e nesta, foram contados os espermatozoides nos quatro quadrantes laterais do hemocitômetro.

As características morfológicas espermáticas (alterações em cabeça ou cauda do espermatozoide) foram analisadas através de esfregaço do lavado do ducto deferente (0,1mL) em lâmina corada com eosina 2% (0,1mL). Foram analisados 200 espermatozoides por animal em microscópio óptico.

### Taxas reprodutivas

A partir dos dados obtidos, foram calculadas as taxas reprodutivas de acordo com U.S. Environmental Protection Agency, USEPA (1996): Taxa de acasalamento: número de fêmeas com diagnóstico positivo de gestação/número de fêmeas acasaladas x 100; Taxa de gestação: número de fêmeas gestantes com filhotes nascidos/número de fêmeas com diagnóstico positivo de gestação x 100; Taxa de natalidade: número de filhotes nascidos vivos/número de filhotes nascidos x 100; Taxa de fertilidade: número de fêmeas acasaladas que gestaram/número de fêmeas acasaladas x 100.

### Análise estatística

As variáveis em questão foram primeiramente submetidas a teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de Bartlett para homocedasticidade. A análise estatística incluiu a análise de variância de uma via (ANOVA) e qui-quadrado. As variáveis quantitativas seguiram o teste de Bonferroni e as qualitativas qui-quadrado. Todas as análises foram executadas usando Statistica 7.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando o valor de *P* foi menor que 0,05. Os valores foram expressos como média e erro padrão da média ( $\pm$ EPM).

## 3. RESULTADOS

### Análise cromatográfica do óleo essencial de alecrim

O óleo essencial utilizado neste estudo foi adquirido de distribuidor comercial, portanto, com o objetivo de definir os compostos majoritários e atestar a pureza do óleo, foi realizada a análise cromatográfica, demonstrando o 1,8 cineol como o composto majoritário (44,85%) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química majoritária do óleo essencial comercial de *Rosmarinus officinalis* L.

Nome do composto	Porcentagem (%)
1,8-cineol	44,85
Cânfora	17,21
Alfa-pineno	13,83
Beta-pineno	10,70



### Consumos de ração e água

Os consumos de ração e água mensurados diariamente para cada animal estão apresentados na forma de consumo relativo, resultado da relação entre a quantidade específica consumida e o peso do animal x 100. Não houve diferença significativa nos consumos de ração e água dos machos antes e durante o acasalamento ( $P > 0,05$ , ANOVA) (Figura 2).

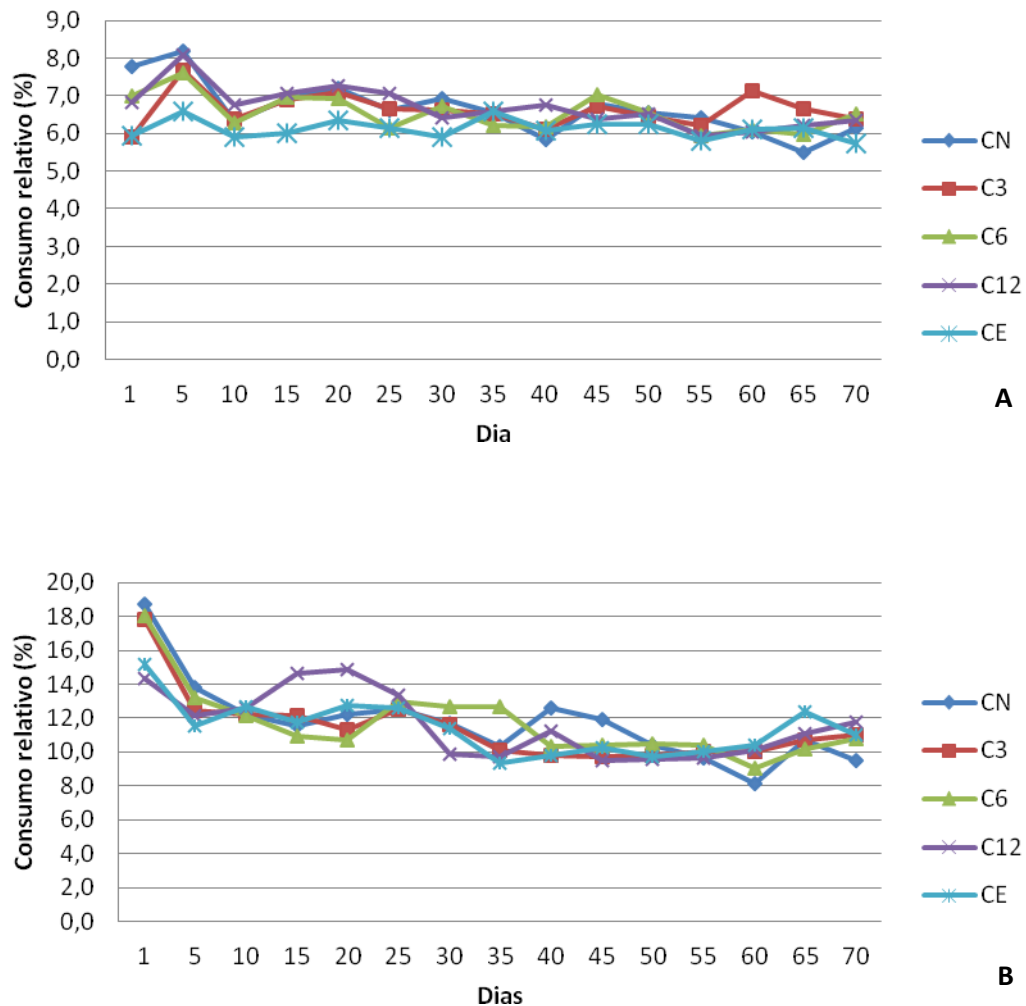
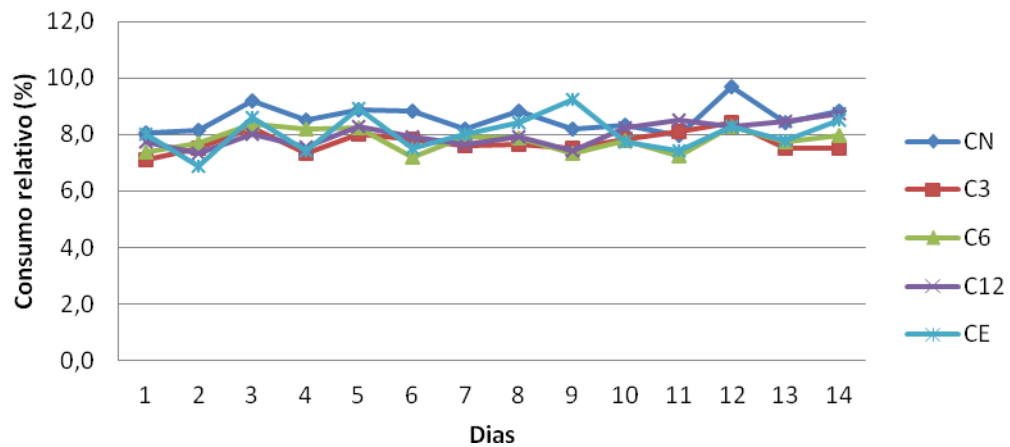
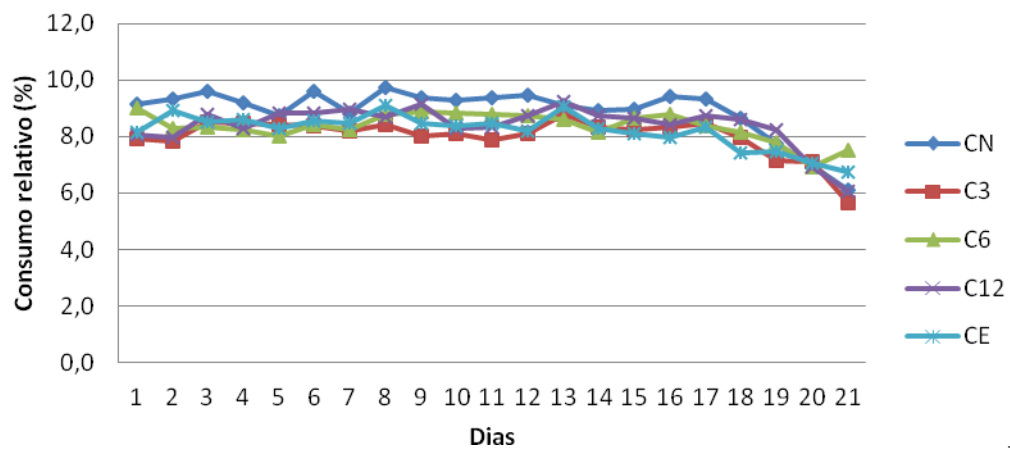


Figura 2. Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração (A) e água (B) de machos tratados com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o período de pré-acasalamento ( $n=10$ /grupo). Os dados são média  $\pm$  EPM.  $P > 0,05$  (ANOVA).

Também não foram encontradas diferenças para o consumo relativo de ração de fêmeas antes do acasalamento e durante o período gestacional ( $P > 0,05$ , ANOVA) (Figura 3).



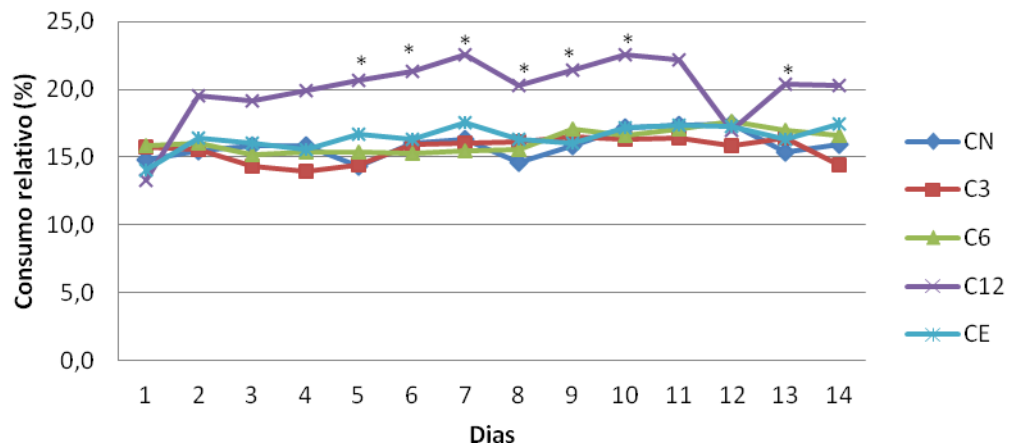
A



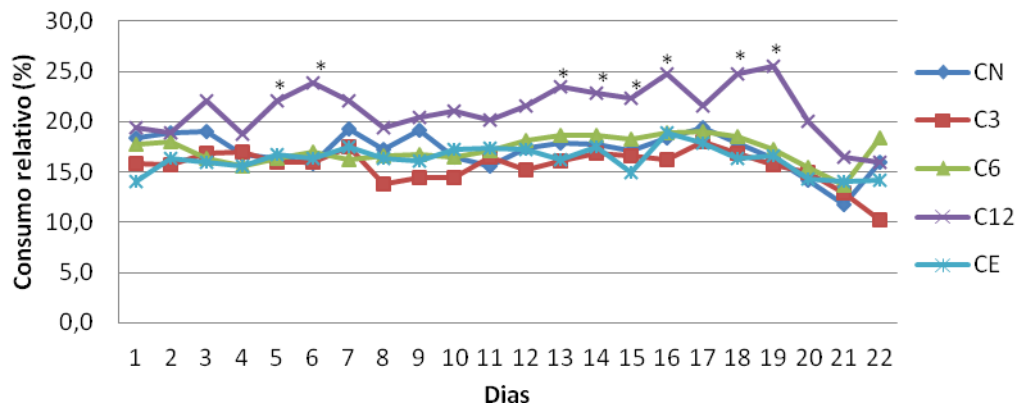
B

Figura 3. Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de ração de fêmeas tratadas com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o pré-acasalamento (A) e gestação (B) ( $n=24, 26, 26, 26$  e  $23$  respectivamente). Os dados são média  $\pm$  EPM.  $P > 0,05$  (ANOVA).

Já para o consumo relativo de água das fêmeas, foram encontradas diferenças significativas tanto no período pré-acasalamento quanto durante a gestação (teste de Bonferroni,  $P < 0,01$ ) (Figura 4).



A



B

Figura 4. Consumo relativo [(peso diário em relação ao consumo diário) x 100] de água de fêmeas tratadas com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o período pré-acasalamento (A) e gestação (B) ( $n=24, 26, 26, 26$  e  $23$  respectivamente). Os dados são média  $\pm$  EPM. \* Diferença significativa ( $P < 0,01$ ). ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

#### Peso relativo dos órgãos

Quando comparados ao grupo CN, houve aumento do peso relativo do fígado para machos em dois grupos testados (C6 e C12) ( $P < 0,01$ ) e diminuição do peso relativo do testículo e epidídimo direitos para os animais do grupo CE ( $P < 0,05$ ). Já para o peso relativo dos órgãos das fêmeas, o tratamento com 1.200 mg.kg<sup>-1</sup> (C12) causou aumento do peso do fígado quando comparado ao grupo CN ( $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2: Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de machos tratados com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE). Os dados são média ± EPM.

Peso relativo %	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Coração	0.26 ± 0.004	0.26 ± 0.009	0.27 ± 0.006	0.26 ± 0.003	0.26 ± 0.004
Baço	0.24 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.22 ± 0.01	0.21 ± 0.007	0.23 ± 0.01
Fígado	3.37 ± 0.16	3.67 ± 0.12	4.10 ± 0.15**	4.78 ± 0.13**	3.87 ± 0.09
Rim direito	0.36 ± 0.006	0.40 ± 0.02	0.54 ± 0.17	0.41 ± 0.007	0.40 ± 0.02
Rim esquerdo	0.32 ± 0.08	0.36 ± 0.01	0.34 ± 0.01	0.37 ± 0.01	0.37 ± 0.01
Testículo direito	0.45 ± 0.008	0.42 ± 0.02	0.42 ± 0.009	0.45 ± 0.01	0.40 ± 0.01*
Testículo esquerdo	0.45 ± 0.008	0.44 ± 0.02	0.43 ± 0.01	0.43 ± 0.009	0.40 ± 0.009
Epidídimo direito	0.15 ± 0.002	0.14 ± 0.006	0.14 ± 0.001	0.14 ± 0.002	0.13 ± 0.005*
Epidídimo esquerdo	0.15 ± 0.002	0.14 ± 0.008	0.14 ± 0.003	0.15 ± 0.004	0.14 ± 0.006
Vesícula seminal	0.17 ± 0.007	0.17 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.01	0.19 ± 0.03

\*\* Diferença significativa ( $P < 0,01$ ), \* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ), em relação ao grupo controle (CN). ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

Tabela 3. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de fêmeas tratadas com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE), ( $n=24, 26, 26, 26$  e  $23$  respectivamente). Os dados são média ± EPM.

Peso relativo %	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Coração	0,31 ± 0,008	0,32 ± 0,005	0,31 ± 0,007	0,38 ± 0,07	0,33 ± 0,009
Baço	0,28 ± 0,009	0,26 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,27 ± 0,01	0,31 ± 0,01
Fígado	4,93 ± 0,22	4,74 ± 0,11	5,06 ± 0,14	5,67 ± 0,21*	4,92 ± 0,14
Rim direito	0,39 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,009	0,43 ± 0,01	0,40 ± 0,01
Rim esquerdo	0,36 ± 0,009	0,39 ± 0,008	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,01	0,38 ± 0,01
Ovário direito	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,2 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,0008
Ovário esquerdo	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001	0,2 ± 0,002	0,02 ± 0,001	0,02 ± 0,001
Útero	0,11 ± 0,008	0,12 ± 0,01	0,10 ± 0,006	0,14 ± 0,02	0,13 ± 0,02

\* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ), em relação ao grupo controle (CN). ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

### Análise Histológica

Os machos e fêmeas dos grupos C3, C6, C12 e CE apresentaram tumefação hepatocelular multifocal na análise do fígado. Para os demais órgãos avaliados não houve alteração histológica.

### Parâmetros reprodutivos dos machos

Não foram encontradas diferenças nos parâmetros reprodutivos de ratos Wistar machos tratados com 300, 600, 1.200 mg.kg<sup>-1</sup> de óleo essencial de alecrim e 134,55 mg/kg de 1,8 cineol ( $P > 0,05$ ) (Tabela 4).

Tabela 4. Parâmetros reprodutivos dos machos tratados com Tween 80, 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE). Os dados são média ± EPM ou percentual.

	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Produção diária de Espermatozoides (x 10 <sup>6</sup> )	45,4 ± 12,0	47,2 ± 8,2	40,5 ± 9,0	44,9 ± 7,3	48,1 ± 4,7
Número de Espermatozoides (x 10 <sup>6</sup> )	479,25 ± 12,4	472,6 ± 36,7	465,43 ± 33,0	375,50 ± 42,4	492,75 ± 38,4
Espermatozoides anormais (%)	6.58 ± 4.78	6.5 ± 2.92	5.31 ± 1.81	6.94 ± 5.45	6.56 ± 2.90
Testosterona sérica (ng/ml)	4,10 ± 1,47	4,79 ± 1,01	6,25 ± 0,51	7,54 ± 0,35	5,25 ± 0,65

### Parâmetros reprodutivos

O desempenho reprodutivo dos animais expostos cronicamente ao óleo essencial de alecrim e 1,8 cineol foi similar ao do grupo controle ( $P > 0,05$ ), mas houve diferença relacionada ao número de filhotes por ninhada e à massa corporal desses ao nascimento para o grupo que recebeu 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol ( $P < 0,05$ ); esse tratamento resultou em menor quantidade de filhotes, e esses de maior massa corporal quando comparados ao grupo controle (Tabela 5).

Tabela 5. Desempenho reprodutivo de animais tratados com Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) durante o pré-acasalamento e acasalamento. Dados expressos em média ± EPM ou percentual.

Desempenho Reprodutivo	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Número de filhotes /ninhada	11,63 ± 0,70	10,06 ± 0,72	9,79 ± 0,60	10,47 ± 0,68	8,3 ± 0,68*
Massa corporal ao nascimento (g)	6,6 ± 0,15	7,0 ± 0,09	6,6 ± 0,11	6,3 ± 0,1	7,1 ± 0,13*
Proporção de sexo (macho:fêmea)	1,72:1	0,96:1	0,72:1	1:1	1,13:1

Continua

Continuação

Desempenho Reprodutivo	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Taxa de gestação (%)	100	100	100	95	90,9
Taxa de natalidade (%)	99,22	99,43	100	100	97,6
Taxa de fertilidade (%)	91,67	77	82,60	80	100

\* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ), em relação ao grupo controle (CN), qui-quadrado ou ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

#### 4. DISCUSSÃO

Os principais constituintes do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* utilizado neste estudo foram: o 1,8 cineol – 44,85%, a cânfora – 17,21%, alfa-pineno – 13,83% e beta-pineno – 10,70%, demonstrando similaridade à composição do óleo de alecrim utilizada por outros autores, também com predominância de monoterpenos (OKOH et al., 2010; WALLER et al., 2016).

Pelo amplo estudo do óleo essencial de alecrim (HUSSAIN et al., 2010; OKOH et al., 2010; CLEFF et al., 2012; WANG et al., 2012; SASAKI et al., 2013; FERLEMI et al., 2015; ABADI et al., 2016; BAN et al., 2016; WALLER et al., 2016), é necessário que se tenham bem definidas as informações sobre a segurança para esta substância. Durante todo o período experimental não foram observadas mortes, alterações comportamentais, piloereção, apatia, prostração, diarreia e convulsões, concordando com outros autores que também relataram a ausência de tais efeitos utilizando extrato ou OEA (SÁ et al., 2006; GUERRA et al., 2009).

A toxicidade sistêmica pode ser identificada pela diminuição do peso corporal dos animais e por alterações nos consumos de água e ração, sendo esses, importantes para a avaliação da toxicidade de uma substância, pois fornecem informações do estado geral de saúde dos animais (VALADARES, 2006). Os dados relativos aos consumos de ração para ambos os sexos e o consumo de água pelos machos não foi diferente entre os grupos tratados e o grupo controle, porém, houve diferença no consumo de água das fêmeas que receberam 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA nos períodos de pré-acasalamento e gestação. Elas consumiram mais água em relação ao grupo controle, porém, nos estudos de desenvolvimento e toxicidade reprodutiva, o fator de importância é a redução do consumo, pois pode acarretar em efeitos na gestação (LEICHTER & LEE, 1984; CAMPBELL et al., 2009). A avaliação dos dados relativos ao consumo de água em estudos de toxicidade reprodutiva e/ou desenvolvimento não devem se basear em

pressupostos não testados, as alterações precisam ser avaliadas em associação aos dados de hidratação, depleção de fluidos e desidratação (CAMPBELL et al.; 2009), que não foram realizados neste experimento, pois o objetivo do estudo é a análise reprodutiva.

A avaliação do fígado tem grande significado em estudos toxicológicos, pois ele é o principal órgão responsável pelo metabolismo, tanto de compostos endógenos quanto exógenos e por esse motivo também é o alvo primário da ação tóxica de xenobióticos ou seus metabólitos (SZACHOWICZ-PETELSKA et al., 2012). Neste trabalho, foram encontrados aumento no peso relativo do fígado de machos dos grupos C6 e C12 e de fêmeas do grupo C12 em comparação ao CN. Guerra et al. (2009) também observaram aumento nos pesos absoluto e relativo do fígado de fêmeas tratadas com 484 e 968 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA. Assim como para Debersac et al. (2001), avaliando o peso deste órgão em ratos tratados com o óleo essencial, folhas, extrato diclorometano e o extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*.

Os resultados histológicos demonstraram tumefação hepatocelular tanto para machos quanto para fêmeas nos grupos C3, C6, C12 e CE. Aumento do fígado, caracterizado por hipertrofia hepatocelular centrolobular acompanhado de indução microssomal enzimática, é uma resposta adaptativa frequente deste órgão quando exposto à xenobióticos (McGUIRE et al., 1986). O óleo essencial de alecrim foi testado em um estudo de toxicidade onde ratas fêmeas receberam por via oral, durante 91 dias a dose de 2400 mg.kg<sup>-1</sup> na dieta (equivalente a aproximadamente 195mg.kg<sup>-1</sup> de massa corporal por dia), seguido por um período de 28 dias sem tratamento. Passados os 91 dias, constatou-se aumento do peso do fígado, quando comparado ao grupo controle, porém, nenhuma alteração macro ou microscópica foram observadas. Amostras do órgão foram colhidas para mensuração de enzimas microssomais hepáticas, que demonstraram um leve aumento em algumas enzimas e um aumento de 1,5 vezes no citocromo P450 total, estas alterações, no entanto, exibiram caráter reversível com a supressão do tratamento, assegurando se tratem de alterações adaptativas e não hepatotoxicidade (AGUILAR et al., 2008).

O efeito do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. no sistema reprodutivo de machos foi relatado por Nusier et al. (2007) como potencialmente tóxico para a fertilidade de ratos adultos Sprague-Dawley na dose de 500 mg.kg<sup>-1</sup>. Os autores constataram diminuição no peso médio do epidídimo, próstata, ducto deferente e vesícula seminal, além de declínio significativo na espermatogênese, no número de espermátócitos, espermátides e nos níveis de testosterona. Alterações microscópicas

foram relatadas por El-Din et al. (2012) na estrutura dos testículos e células germinativas de ratos tratados com a mesma dose do trabalho citado anteriormente (500 mg.kg<sup>-1</sup>). Nossos resultados foram divergentes, pois não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos tratados com óleo essencial e o grupo controle para os indicadores de fertilidade dos machos, nem para o peso dos órgão reprodutivos, o que também foi relatado por Sá et al. (2006) na administração de extrato aquoso nas doses de 291,2 e 582,4 mg . kg<sup>-1</sup>.

O 1,8-cineol, ou eucaliptol, é um monoterpeneo natural presente em várias espécies de plantas (JUERGENS et al., 2003) e também foi relatado como composto majoritário do *Rosmarinus officinalis* L. por outros autores (PINTORE et al., 2002; WANG et al., 2008; WALLER et al., 2016). Suas atividades despertam grande interesse na pesquisa pelos efeitos anti-inflamatório (JUERGENS et al., 2003), broncodilatador (JUERGENS et al., 1998), antimicrobiano (SOKOVIĆ et al., 2010) e antiviral (YANG et al., 2010). Há relato de citotoxicidade, apenas em células já danificadas (DÖRSAM et al., 2015) e resultados sugestivos de toxicidade materna e fetal (CALDAS et al., 2016).

Os efeitos do 1,8 cineol neste estudo demonstram que os pesos do testículo e epidídimo direitos foram menores para o grupo CE em comparação com o grupo CN. No entanto, não foram encontradas alterações nos índices reprodutivos avaliados, sugerindo que nessas condições experimentais o 1,8 cineol não interferiu na função reprodutiva. Um agente que atue diretamente sobre os epidídimos, fluido epididimal ou testículos, afeta também os espermatozoides, além disso, a redução no peso dos testículos é indicativa de alteração tóxica somente quando associada à alterações em indicadores mais confiáveis de fertilidade dos machos, como produção diária, alterações e contagem de espermatozoides (AMANN, 1986). A espessura do epitélio germinativo também é um parâmetro muito importante na avaliação de machos, e alterações em sua estrutura estão relacionadas a problemas hormonais (ROMANO et al., 2010).

Com relação ao desempenho reprodutivo, não foram encontradas diferenças estatísticas para os grupos tratados com o óleo essencial de alecrim nas taxas de acasalamento, gestação, fertilidade e natalidade, tampouco na proporção de sexos dos filhotes nascidos, número de filhotes por ninhada e massa corporal ao nascimento. Porém, a taxa de fertilidade e acasalamento do grupo C3 apresentou-se menor do que todos os outros grupos estudados, sugerindo que doses mais próximas a esta devem ser investigadas. O tratamento de fêmeas com extrato aquoso de *R. officinalis* provavelmente interfira na implantação embrionária, aumentando as perdas pré-



implantação, mas não interferiu com os conceitos após este período (LEMONICA et al., 1996).

Para o grupo tratado com 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol, o número de filhotes por ninhada ao nascimento foi menor e a massa corporal maior quando comparados ao grupo controle. Estes resultados não foram os mesmos para Caldas et al. (2016), que não encontraram diferenças no número de filhotes por ninhada em ratos tratados com 250, 500 e 1000 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol; esses autores relatam diminuição na massa corporal ao nascimento para os animais tratados com a maior concentração, porém esse resultado foi relacionado ao menor ganho de massa corporal das fêmeas desse grupo nos períodos pré-implantação e gestacional. O feto é especialmente vulnerável a danos em virtude da exposição a compostos químicos que atravessam a placenta e/ou a barreira cerebral ainda imatura (RICE & BARRONE, 2000; COSTA et al., 2004). O período perinatal pode ser dividido em quatro fases de desenvolvimento: implantação, organogênese, desenvolvimento fetal e neonatal. No rato, o período de implantação ocorre aproximadamente, na primeira semana da prenhez e qualquer exposição a agentes tóxicos neste período inicial de desenvolvimento, normalmente leva à embriofetalidade. Este mesmo desfecho pode ser notado quando a exposição ocorre no período organogênico (desde a proliferação, diferenciação e migração celular até a organogênese propriamente dita) (BERNARDI; 2014). O extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis* pode interferir na implantação embrionária (LEMONICA et al., 1996) e esse estudo sugere que o 1,8 cineol seja um componente importante desse efeito.

O OEA nas doses utilizadas não interferiu nos parâmetros reprodutivos dos animais experimentais, indicando reduzido potencial de toxicidade sobre este sistema. A constatação de que o 1,8 cineol, composto majoritário do óleo, provocou redução do número de filhotes por ninhada e diminuiu o peso dos testículos e epidídimos pode justificar a continuidade dos estudos com elevação das doses do OEA.

## REFERÊNCIAS

ABADI, M.N.A.; MORTAZAVI, M.; KALANI, N.; MARZOUNI, H.Z.; KOOTI, W.; ALI-AKBARI, S. Effect of hidroalcoholic extract of *Rosmarinus officinalis* L. leaf on anxiety in mice. **Journal of Evidence-Based Complementary & Alternative Medicine**. v.21, n.4 p.85-90, 2016.

AGUILAR, F. et al. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission on

the use of rosemary extracts as a food additive. **The EFSA journal**. v.721, p.1-29, 2008.

AMANN, R.P. Detection of alterations in testicular and epididymal function in laboratory animals. **Environmental Health Perspectives**. v. 70, p. 149-158, 1986.

ANDRADE, E.L.; BENTO, A.F.; CAVALLI, J.; OLIVEIRA, S.K.; SCHWANKE, R.C.; SIQUEIRA, J.M.; FREITAS, C.S.; MARCON, R.; CALIXTO, J.B. Non-clinical studies in the processo of new drug development – Part II: Good laboratory practice, metabolism, pharmacokinetics, safety and dose translation to clinical studies. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 49, n. 12, p.1-19, 2016.

BAN, L.; NARASIMHAMOORTHY, B.; ZHAO, L.; GREAVES, J.A.; SCHROEDER, W.D. Antioxidant activities from different rosemary clonal lines. **Food Chemistry**. v. 201, p.259-263, 2016.

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 781-788, 2014.

CALDAS, G.R.F.; LIMEIRA, M.M.F.; ARAÚJO, A.V.; ALBUQUERQUE, G.S.; SILVA-NETO, J.C.; SILVA, T.G.; COSTA-SILVA, J.H.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; WANDERLEY, A.G. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 96, p. 297-306, 2016.

CAMPBELL, M.A.; GOLUB, M.S.; IYER, P.; KAUFMAN, F.L.; LI, L.; MESSEN, F.M.; MORGAN, J.E.; DONALD, J.M. Reduced water intake: implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. **Birth Defects Research (Part B)**. v.86, p. 157- 175, 2009.

CLEFF, M.B. MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.43-49, 2012.

COSTA, L.; ASCHNER, M.; VITALONE, A.; SYVERSEN, T.; SOLDIN, O. Developmental neuropathology of environmental agents. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**. v. 44, p. 87-110, 2004.

DEBERSAC, P.; VERNEVAUT, M.F.; AMIOT, M.J.; SUSCHETET, M.; SIESS, M.H. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. **Food and Chemical Toxicology**. v. 39, p. 109-117, 2001.

DÖRSAM, B.; WU, C.; EFFERTH, T.; KAINA, B.; FAHRER, J. The eucalyptus oil ingredient 1,8-cineol induces oxidative DNA damage. **Arch. Toxicology**. v.89, p. 797-805, 2015.

DWECK, A.C. Toxicology of essential oils reviewed. **Personal Care**. p. 65-77, 2009.

EL-DIN, R.A.S.; EL-SHAHAT, A.E. & ELMANSY, R.A. An electron microscopic study of the antifertility potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in male albino rats. **Int. J. Morphol.** v.30, n.2, p.666-672, 2012.

FERLEMI, A.; KATSIKOUDI, A.; KONTOGIANNI, V.G.; KELLICI, T.F.; IATROU, G.; LAMARI, F.N.; TZAKOS, A.G.; MARGARITY, M. Rosemary tea consumption results to anxiolytic-and anti-depressant-like behavior of adult male mice and inhibits all cerebral area and liver cholinesterase activity; phytochemical investigation and in silico studies. **Chemico-Biological Interactions.** v. 237, p. 47-57, 2015.

GUERRA, M. O.; BORGES, N.B.E.; BELLEI, P.M.; ELIAS, M.A.F.; SILVEIRA, S.M.C.; PETERS, V.M. Intra uterine growth retardation in rats treated with essential oil of *Rosmarinus officinalis* Linn. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais.** v.1, n.1, p.8-13, 2009.

HUSSAIN, A.I., ANWAR, F., CHATHA, S.A.S., et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: Antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1070-1078, 2010.

JUERGENS, U.R.; DETHLEFSEN, U.; STEINKAMP, G.; GILLISSEN, A.; REPGES, R.; VETTER, H. Antiinflammatory activity of 1,8 cineole (eucalyptol) in bronchial asthma: a double blind placebo-controlled. **Trial. Respir. Med.** v. 97, p. 250-256, 2003.

JUERGENS, U.R.; STÖBER, M.; SCHMIDT-SCHILLING, L.; KLEUVER, T.; VETTER, H. Antiinflammatory effects of eucalyptol (1.8-cineole) in bronchial asthma: inhibition of arachidonic acid metabolism in human blood monocytes ex vivo. **J. Med.Res.** v. 3, p. 407-412, 1998.

LEICHTER, J.; LEE, M. Does dehydration contribute to retarded fetal growth in rats exposed to alcohol during gestation? **Life Sci.** v. 35, p. 2105–2111, 1984.

LEMONICA, I.P., DAMASCENO, D.C., DI-STASI L.C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 29, n. 2, p. 223-227, 1996.

McGUIRE, E.J.; DiFONZO, C.J.; MARTIN, R.A.; IGLESIA, F.A. Evaluation of chronic toxicity and carcinogenesis in rodents with the synthetic analgesic, tilidine fumarate. **Toxicology.** v. 39, p. 149-163, 1986.

NUSIER, M.K., BATAINEH, H.N., DARADKAH, H.M. Adverse effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rat. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 809-213, 2007.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry.** v.120, n.1, p. 308-312, 2010.

PIFFER, R.C.; GARCIA, P.C.; GERARDIN, D.C.; KEMPINAS, W.G.; PEREIRA, O.C. Semen parameters, fertility and testosterone levels in male rats exposed prenatally to betamethasone. **Reprod. Fertil. Dev.** v.21, p.634-639, 2009.

PINTORE, G.; USAI, M.; BRADESI, P.; JULIANO, C.; BOATTO, G.; TOMI, F.; CHESSA, M.; CERRI, R.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. **Flavour Fragr. J.** v. 17, p. 15-19, 2002.

RICE, D.; BARONE JÚNIOR., S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives Supplements**, Triangle, v. 108, S3, p. 511-533, 2000.

ROBB, G.W.; AMANN, R.P.; KILLIAN, G.J. Daily sperm production and epididymal sperm reserves of pubertal and adults rats. **J. Reprod. Fert.** v.54, p. 103-107, 1978.

ROMANO, R. M. ; ROMANO, MA ; BERNARDI, M. M. ; FURTADO, P.V.; OLIVEIRA, C. A. Prepubertal exposure to commercial formulation of the herbicide glyphosate alters testosterone levels and testicular morphology. **Reproductive Toxicology**, v. 84, p. 309-317, 2010.

SÁ, R.C.S., LEITE, M.N., OLIVEIRA, L.G. et al. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male Wistar rats' organs and reproductive system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 n. 3, p. 324-332, 2006.

SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104f. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS.

SASAKI, K.; OMRI, A.E.; KONDO, S.; HANA, J.; ISODA, H. *Rosmarinus officinalis* polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**. v. 238, p. 86-94, 2013.

SOKOVIĆ, M. ; GLAMOČLIJA, J. ; MARIN, P. D.; GRKIĆ, D.; GRIENSVEN, L.I. Antibacterial effects of the essential oils of commonly consumed medicinal herbs using an *in vitro* model . **Molecules**. v. 15, p. 7532-7546, 2010.

SZACHOWICZ-PETELSA, B.; DOBRZYNSKA, I.; SKRZYDLEWESKA, E.; FIGASZEWSKI, Z. Protective effect of blackcurrant on liver cell membrane of rats intoxicated with ethanol. **Journal Membr. Biol.** v. 245, p. 191-200, 2012.

U.S. Environmental Protection Agency, USEPA. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. (EPA/630/R-96/009), Washington, Federal Register v. 61, n. 212, p. 56274-56322, 1996.

VALADARES, M.C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégia após a “Era do Teste DL<sub>50</sub>”. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VEIGA JR, V.F.; PINTO, A.C. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Química Nova (Impresso)**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; SILVA, A.L.; CASTRO, L.L.D.; CLEFF, M.B.; FERRAZ, V.; MEIRELES, M.C.; ZANETTE, R.; MELLO, J.R. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oil of Lamiaceae family. **Mycopathologia**. v. 181, p. 857-863, 2016.

WANG, W. et al. Antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**. v.17, p.2704-2713, 2012.

WANG, W.; WU, N.; ZU, Y.G.; FU, Y.J. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chem**. v. 108, p. 1019-1022, 2008.

YANG, Z.; WU, N.; FU, Y.; YANG, W.; ZU, Y.; EFFERTH, T. Anti-infectious bronchitis virus (IBV) activity of 1,8-cineole: effect on nucleocapsid (N) protein. **J Biomol Struct Dyn**. v. 28, p. 323-330, 2010.

ZUH, B.T. et al. Dietary administration of an extract from rosemary leaves enhances the liver microsomal metabolism of endogenous estrogens and decreases their uterotrophic action in CD-1 mice. **Carcinogenesis**. v.19, n.10, p.1821-1827, 1998.

## CAPÍTULO V

### ARTIGO 3

#### **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Rosmarinus officinalis* (ALECRIM) E SEU COMPOSTO MAJORITÁRIO (1,8 CINEOL) SOBRE A FERTILIDADE DE RATAS E MORFOLOGIA ÓSSEA DOS FETOS**

Luciana Dalazen dos Santos<sup>a\*</sup>, Clarissa Boemler Hollembach<sup>b</sup>, Luiz Carlos Klein-Júnior<sup>c</sup>, Andrea dos Santos Dantas<sup>a</sup>, Rafaela Centeno<sup>b</sup>, Fernanda Bastos de Mello<sup>b</sup>, João Roberto Braga de Mello<sup>a,b</sup>.

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>b</sup> Laboratório de Produtos Naturais/Fitoquímica – Farmacologia e Toxicologia Veterinária, Departamento de Farmacologia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

<sup>c</sup> Laboratório de Farmacognosia e Controle de Qualidade de Fitomedicamentos, Faculdade de Farmácia, UFRGS, Porto Alegre, RS, Brasil

\* Autor para correspondência: Luciana Dalazen dos Santos; Rua Sarmento Leite, 500, CEP 90050-170, Porto Alegre, RS, Brasil; lu\_dalazen@hotmail.com

**RESUMO** - Tendo em vista as diversas possibilidades de utilização terapêutica do óleo essencial de alecrim, é de extrema importância definir a segurança para o feto quando a fêmea gestante ingere esta substância. Portanto, o propósito do presente estudo foi determinar se o óleo essencial de alecrim e seu composto majoritário afetam a fertilidade de ratas e o desenvolvimento fetal, durante o período organogênico, que possa desencadear malformações ósseas. Para tanto, fêmeas gestantes foram tratadas, via oral (gavagem), uma vez ao dia do 6º ao 15º dia de gestação. Os grupos estudados foram: CN (controle negativo – Tween 80), C3 (OEA 300 mg.kg<sup>-1</sup>), C6 (OEA 600 mg.kg<sup>-1</sup>), C12 (OEA 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e CE (1,8 cineol 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>). No 21º dia de gestação foi realizada a cesareana, o útero foi pesado antes da remoção dos fetos, e estes foram avaliados individualmente quanto as seguintes características: número de fetos vivos e mortos, peso, proporção entre os sexos e malformações externas, os fetos foram, então, submetidos à técnica de diafanização, corados com vermelho de alizarina e avaliados individualmente quanto à presença de alterações ósseas baseadas em atlas de anomalias ósseas externas de ratos. Nas fêmeas, foram avaliados sinais de toxicidade, taxa de natalidade, perdas pós-implantação, consumos de água e ração, peso relativo e histologia dos órgãos. Não houve alteração nos índices reprodutivos e fetais avaliados, porém mesmo não significativa estatisticamente, houve uma tendência para o aumento das perdas pós-implantação para os grupos que receberam OEA. As fêmeas não apresentaram sinais de toxicidade sistêmica. No entanto, os tratamentos interferiram no desenvolvimento fetal demonstrado pelo retardo no desenvolvimento esquelético em todos os grupos, sugerindo que a exposição à estas doses do óleo essencial e 1,8 cineol devem ser evitadas em gestantes. Os grupos C6, C12 e CE apresentaram maior proporção de fetos com anormalidades no esqueleto (78,31%, 100% e 95,06%,

respectivamente). Houve ainda aumento no peso relativo do fígado para os grupos C12 e CE e aumento no peso relativo do baço para o grupo CE.

**Palavras chave:** Teratogenicidade. Embriotoxicidade. Alecrim. Óleo essencial.

**ABSTRACT** - *In view of the various possibilities of therapeutic use of rosemary essential oil, it is of utmost importance to define safety for the fetus when the pregnant female ingests this substance. Therefore, the purpose of the present study was to determine whether essential oil of rosemary and its major compound affect the fertility of rats and fetal development, during the organogenic period, that can trigger bone malformations. For this purpose, pregnant females were treated orally (gavage) once daily from the 6th to the 15th day of gestation. The groups studied were: NC (negative control - Tween 80), C3 (REO 300 mg.kg<sup>-1</sup>), C6 (REO 600 mg.kg<sup>-1</sup>), C12 (REO 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e CE (1,8 cineol 134,55 mg.kg<sup>-1</sup>). On the 21st day of gestation the cesarean was performed, the uterus was weighed before the fetuses were removed, and these were evaluated individually for the following characteristics: number of live and dead fetuses, weight, sex ratio and external malformations, the fetuses were then submitted to the diaphanization technique, stained with alizarin red and evaluated individually for the presence of bone changes based on atlas of external bone anomalies of rats. In the females, signs of toxicity were evaluated, birth rate, post-implantation losses, water and feed intake, relative weight and organ histology. There was no change in the reproductive and fetal indexes evaluated, but not even statistically significant, there was a tendency for the increase in the post-implantation losses, the larger the dose tested, for the groups that received REO. Females showed no signs of systemic toxicity. However, treatments interfered in fetal development demonstrated by skeletal developmental delay in all groups, suggesting that exposure to these doses of essential oil and 1,8-cineol should be avoided in pregnant women. Groups C6, C12 and CE presented a higher proportion of fetuses with skeletal abnormalities (78,31%, 100% and 95,06%, respectively). There was also an increase in the relative weight of the liver for the C12 and CE groups and an increase in the relative weight of the spleen for the CE group.*

**Key words:** Teratogenicity. Embryotoxicity. Rosemary. Essential oil.

## 1. INTRODUÇÃO

A exposição de fetos a certos agentes químicos durante o período gestacional podem aumentar os riscos de efeitos adversos como a embriofetalidade, alterações comportamentais, no desenvolvimento geral e malformações ósseas (FARRAR & BLUMER; 1991). Dentre estes, o último é caracterizado como uma mudança estrutural permanente que afeta negativamente a sobrevivência ou a saúde das espécies investigadas (CHAHOUUD et al.; 1999a) e tem sido alvo de pesquisas (ASHBY et al., 1976; PARK et al., 2009; CASSINA et al., 2017; VIANNA et al., 2017; WATSON et al., 2017) a fim de caracterizar novos agentes e o mecanismo de ação daqueles já conhecidos. Porém, na investigação de possíveis substâncias teratogênicas, é de suma importância definir se os efeitos observados são decorrentes de toxicidade materna ou

de uma interação direta da substância com o embrião (CHAHOUUD et al.; 1999b). Alguns dos sinais que podem estar correlacionados à toxicidade materna são as reduções significativas nos consumos de água e/ou ração e sinais clínicos adversos e/ou morte (ROGERS et al.; 2005). Os autores ainda relatam que elucidar esta questão é de suma importância para o registro de novos medicamentos.

Waller et al. (2016) relatam que o óleo essencial de alecrim demonstrou atividade anti *S. brasiliensis*, sugerindo-o como candidato para o desenvolvimento de fármacos que possam ser utilizados no tratamento da esporotricose, não sendo descartada a possibilidade do tratamento ser a longo prazo e que a gestação esteja nele incluída.

O Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) é uma planta pequena, da família Lamiaceae, de porte subarborescente lenhoso; possui folhas pequenas, lineares, coriáceas, opostas, lanceoladas e muito aromáticas, as flores são azulado-claras, pequenas e de aroma forte e agradável. Nativa da região Mediterrânea é cultivada em quase todos os países de clima temperado (HANSON, 2016).

Os extratos metanólicos de *Rosmarinus officinalis* L. produziram efeitos estimulatórios no metabolismo hepático de estradiol e estrona e este efeito foi acompanhado pela diminuição da ação uterotrópica destes estrógenos (ZUH et al.; 1998). Lemonica et al. (1996), concluíram que o extrato aquoso, quando administrado na dose de 26 mg.dia<sup>-1</sup>, pode interferir no período de implantação, mas não encontraram diferenças de malformações e/ou anormalidades fetais.

Portanto, o propósito da presente pesquisa foi determinar se o óleo essencial de alecrim e seu composto majoritário afetam a fertilidade de ratas e o desenvolvimento fetal, durante o período organogênico, que possa desencadear malformações ósseas e ainda, contribuir com os estudos já existentes e ratificar as informações referentes ao uso do alecrim durante a gestação.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### Insumos

Foi utilizado óleo essencial de alecrim comercial, adquirido da empresa Ferquima Indústria e Comércio Ltda (São Paulo, Brasil), com certificação de qualidade e 1,8 cineol (Sigma, Solon, OH, USA). A análise qualitativa e quantitativa do óleo foi realizada no laboratório do Instituto de Química da UFRGS, Porto Alegre/RS, por



cromatografia gasosa com detector de massas, injetor split/splitless, GC/MS Shimadzu QP-5050A.

### Animais

Todos os procedimentos utilizando animais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais/UFRGS, Porto Alegre, RS, número 26988.

Para avaliar os efeitos do óleo essencial de alecrim e seu composto majoritário (1,8-cineol) na fertilidade de ratas e desenvolvimento fetal, foram utilizados 17 machos e 51 fêmeas nulíparas, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Durante todo o período experimental, os animais foram mantidos em biotério sob condições constante de umidade ( $50\% \pm 5$ ), temperatura ( $21^{\circ}\text{C} \pm 2$ ), ciclo de luz claro/escuro de 12h e alimentados com ração comercial (Nuvital CR 1, Nuvital, Colombo, PR) e água *ad libitum*.

### Protocolo Experimental

O acasalamento foi realizado em três ciclos de cinco dias consecutivos, com intervalos de dois dias, em uma proporção de três fêmeas para cada macho. As fêmeas permaneceram na caixa dos machos por 2h (6:00-8:00). O início da gestação (GD0) foi constatado através de esfregaço vaginal contendo espermatozoide e o óleo essencial de alecrim e o 1,8-cineol administrados para as fêmeas uma vez ao dia, via oral (gavagem) em um volume de 1mL/100g de peso corporal, do 6° (GD6) ao 15° (GD15) dia de gestação. As doses do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* foram estabelecidas de acordo com estudos prévios de atividade antimicrobiana *in vitro* realizados por Santin (2013).

*Grupo I* – Controle negativo, fêmeas tratadas com o veículo da preparação da solução de tratamento, Tween 80.

*Grupo II* – Composto majoritário ( $134,55 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas tratadas com solução de 1,8 cineol na concentração 44,85% (proporcional à quantidade do composto na solução de óleo essencial 12%).

*Grupo III* – Dose 1 ( $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas tratadas com óleo essencial de alecrim 3% em emulsão contendo Tween 3%.

*Grupo IV* – Dose 2 ( $600 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas tratadas com óleo essencial 6% em emulsão contendo Tween 3%.

*Grupo V* – Dose 3 ( $1.200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), fêmeas tratadas com óleo essencial 12% em emulsão contendo Tween 3%.

As fêmeas tiveram a massa corporal e os consumos de ração e água mensurados diariamente, bem como, foram observadas quanto à presença de hemorragia, aborto ou possíveis alterações sistêmicas.

#### Cesárea e Coleta de órgãos

No GD21 foi realizada a cesareana, o útero foi pesado antes da remoção dos fetos, estes foram avaliados individualmente quanto as seguintes características: número de fetos vivos e mortos, peso, proporção entre os sexos e malformações externas. A taxa de natalidade foi calculada como a seguir: número de filhotes nascidos vivos/número de filhotes nascidos x 100 e as perdas pós-implantação: (número de sítios de implantação – número de fetos vivos) x 100/ número de sítios de implantação (LEMONICA et al., 1996). Coração, baço, fígado e os rins foram coletados, e avaliados em relação a possíveis alterações macroscópicas, e então a massa de cada órgão foi mensurada e relacionada com a massa corporal do indivíduo, em seguida foram fixados em solução de formalina tamponada e, examinados no Laboratório de Patologia Veterinária, Departamento de Patologia e Clínica Veterinária da Faculdade de Veterinária da UFRGS.

#### Processo de Diafanização e Coloração dos Fetos

Os fetos foram submetidos à técnica de diafanização modificada de Taylor & Van Dyke, (1985) e avaliados individualmente quanto à presença de alterações ósseas baseadas em atlas de anomalias ósseas externas de ratos (CHAHOU, 1996). Fetos previamente fixados em formol 10% foram desidratados por 24 horas em álcool etílico 70% e em álcool etílico 96°GL. Posteriormente foram eviscerados e imersos em solução tampão de borato de sódio 30% por 2 dias, com troca de solução em 24h. A clarificação dos fetos foi realizada em solução de borato de sódio 30% acrescido de 1g/L de tripsina, em temperatura ambiente, pelo período necessário, sendo a solução trocada sempre que apresentasse aspecto turvo. Para coloração dos esqueletos foi utilizada solução de hidróxido de potássio 1,5% adicionada de corante vermelho de alizarina, por 24h. Após, os fetos passaram por solução de glicerina em hidróxido de potássio 1,5%, em concentrações de 30% e 70%, 48h em cada e foram armazenados em glicerina PA, para posterior avaliação (DANTAS, 2016).

### Análise Estatística

As variáveis foram primeiramente submetidas a teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e teste de Bartlett para homocedasticidade. A análise estatística incluiu a análise de variância de uma via (ANOVA) e qui-quadrado. As variáveis quantitativas seguiram o teste de Bonferroni e as qualitativas qui-quadrado. Todas as análises foram executadas usando Statistica 7.0 (Statsoft Inc, Tulsa, OK, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas significantes quando o valor de  $P$  foi menor que 0,05. Os valores foram expressos como média e erro padrão da média ( $\pm$ EPM).

## 3. RESULTADOS

### Análise cromatográfica do óleo essencial de alecrim

O óleo essencial utilizado neste estudo foi adquirido de distribuidor comercial, portanto, com o objetivo de definir os compostos majoritários e atestar a pureza do óleo, foi realizada a análise cromatográfica, demonstrando o 1,8 cineol como o composto majoritário (44,85%) (Tabela 1).

Tabela 1. Composição química majoritária do óleo essencial comercial de *Rosmarinus officinalis* L.

Nome do composto	Porcentagem (%)
1,8-cineol	44,85
Cânfora	17,21
Alfa-pineno	13,83
Beta-pineno	10,70

Não foram evidenciadas hemorragia, abortos, diferenças nos consumos de água, ração, tampouco na massa corporal ou qualquer outra alteração sistêmica nas fêmeas. Quanto ao peso relativo dos órgãos, houve aumento significativo no peso do fígado para o grupo C12 e nos pesos do baço e fígado do grupo CE em relação ao grupo CN (teste de Bonferroni,  $P < 0,05$ ) (Tabela 2).

Tabela 2. Peso relativo dos órgãos [(massa do órgão em relação à massa corporal) x 100] de fêmeas expostas a Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) do 6° ao 15° dia de gestação. Os dados são média ± EPM.

Peso relativo %	Grupos				
	CN (n= 12)	C3 (n=10)	C6 (n=10)	C12 (n=9)	CE (n=10)
Coração	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,24 ± 0,01	0,25 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Baço	0,22 ± 0,02	0,23 ± 0,01	0,26 ± 0,02	0,24 ± 0,01	0,29 ± 0,01*
Fígado	3,71 ± 0,16	3,74 ± 0,10	3,97 ± 0,12	4,11 ± 0,12*	4,32 ± 0,15*
Rim esquerdo	0,31 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,29 ± 0,02	0,28 ± 0,01	0,28 ± 0,02
Útero	20,36 ± 1,14	24,00 ± 1,15	21,42 ± 2,07	22,24 ± 1,43	19,63 ± 2,00

\* (p<0,05) em relação ao grupo controle (CN). ANOVA, seguida de teste de Bonferroni.

A administração do óleo essencial de alecrim e do seu composto majoritário, 1,8 cineol, não causaram diferenças para os índices reprodutivos estudados nas fêmeas: número de filhotes por ninhada, perdas pós-implantação e taxa de natalidade. As três doses de óleo essencial testadas e o 1,8 cineol não alteraram o desenvolvimento embrionário e fetal através dos índices fetais estudados (massa corporal dos fetos ao nascimento, proporção entre os sexos e taxa de malformações externas) ( $P > 0,05$ ) (Tabela 3).

Tabela 3. Índices reprodutivos das progenitoras expostas a Tween 80 (CN), 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) do 6° ao 15° dia de gestação. Os dados são média ± EPM.

Índices reprodutivos	Grupos				
	CN	C3	C6	C12	CE
Número de progenitoras	12	10	10	9	10
Número de fetos	139	117	96	91	99
Massa corporal ao nascimento (g)	4,61 ± 0,13	5,16 ± 0,18	4,85 ± 0,11	4,61 ± 0,14	4,93 ± 0,16
Proporção de sexo (macho:fêmea)	1,16:1	1,84:1	1,03:1	1,37:1	1,33:1
Número de filhotes /ninhada	11,58 ± 0,8	11,70 ± 0,9	10,67 ± 1,0	11,38 ± 1,0	9,90 ± 1,3
Perdas pós-implantação (%)	3,92 ± 1,76	3,88 ± 1,31	4,87 ± 2,89	9,32 ± 3,41	1,11 ± 0,11
Taxa de natalidade (%)	100	100	100	100	100
Taxa de malformações externas (%)	0	1,71	2,02	2,10	1,01

Houve diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) na ocorrência de anomalias em fetos expostos ao óleo essencial e ao composto majoritário. A Tabela 4 apresenta alterações ósseas de posição, ausência, forma (malformação óssea) e problemas de calcificação óssea. Os grupos C6, C12 e CE apresentaram maior porcentagem de fetos com anormalidades no esqueleto quando comparados ao grupo CN. Os grupos C12 e CE apresentaram maior taxa de pobre ossificação na cabeça. Os grupos C3 e C6, maior porcentagem de supraoccipitais com pobre ossificação e esternébras irregulares, já o grupo CE diferiu do CN com maior taxa de pobre ossificação nos membros torácicos e fêmures.

Tabela 4. Percentual de alterações esqueléticas em fetos de fêmeas tratadas com 300 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C3), 600 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C6), 1200 mg.kg<sup>-1</sup> de OEA (C12) e 134,55 mg.kg<sup>-1</sup> de 1,8 cineol (CE) do 6° ao 15° dia de gestação.

	<b>Grupos</b>				
	CN	C3	C6	C12	CE
<b>Fetos com anormalidades no esqueleto (%)</b>	43,30	58,24	78,31*	100*	95,06*
Fetos com anormalidades em (%)					
<b>CABEÇA</b>					
Pobre ossificação	33,10	18,68	4,82	86,60*	77,78*
Supraoccipital com incompleta ossificação	0,00	3,30	4,82	0,00	0,00
Supraoccipital com pobre ossificação	0,00	21,98*	50,60*	0,00	4,94
Interparietal com pobre ossificação	0,00	0,00	0,00	0,00	1,23
Fusão frontal com parietal	0,00	0,00	0,00	3,09	0,00
Fusão supraoccipital com parietal	0,00	0,00	1,20	0,00	0,00
Justaposição de interparietais, parietais e frontais	7,90	12,09	0,00	4,12	0,00
Justaposição interparietais com parietais	0,00	2,20	1,20	0,00	0,00
<b>ESTERNO</b>					
Clavícula com posição irregular	0,00	2,20	0,00	0,00	0,00
Clavícula com pobre ossificação	0,00	5,49	0,00	0,00	4,94
Esternébras irregulares	0,00	8,79*	33,73*	2,06	0,00
Esternébras com pobre ossificação	0,00	0,00	1,20	5,15	2,47
<b>COLUNA VERTEBRAL</b>					
Cervical com pobre ossificação	0,00	2,20	0,00	0,00	0,00
Lombar com pobre ossificação	0,00	3,30	0,00	0,00	0,00
<b>MEMBROS TORÁDICOS</b>					
Pobre ossificação	0,00	2,20	0,00	0,00	16,05*
<b>MEMBROS PÉLVICOS</b>					
Fêmures com incompleta ossificação	0,00	1,10	0,00	0,00	0,00
Fêmures com pobre ossificação	0,00	0,00	1,20	4,12	22,22*

\* Diferença significativa ( $P < 0,05$ ), qui-quadrado.

#### 4. DISCUSSÃO

O período embrionário referido como pós-implantação, é definido como o intervalo entre a completa implantação até o final da organogênese do feto (FOOTE & CARNEY; 2000), ele compreende desde a proliferação, diferenciação e migração celular até a formação dos órgãos rudimentares, e qualquer substância química que ao ser administrada para a gestante durante esta fase cause lesão compatível com a vida ao feto, é referida como teratogênica (BERNARDI, 2014). É provável que metabólitos de óleos essenciais atravessem a placenta devido ao íntimo (mas não direto) contato entre o sangue materno e embrionário ou fetal. Substâncias lipofílicas podem migrar por difusão passiva entre estas duas circulações e atingir níveis equivalentes entre o sangue materno e fetal. Estas substâncias são biotransformadas em compostos polares e podem se acumular no feto (BURFIELD, 2000).

O presente estudo objetivou avaliar três concentrações do óleo essencial de alecrim (300, 600 e 1200 mg.kg<sup>-1</sup>) e de 1,8 cineol (134,55 mg.kg<sup>-1</sup>) em fêmeas gestantes, durante o período de organogênese, com a finalidade de definir os efeitos na fertilidade das fêmeas e no desenvolvimento embrionário e fetal.

A organogênese é altamente sensível à exposição de substâncias tóxicas (OXENDINE et al.; 2006) e esta interação pode desencadear efeitos adversos no desenvolvimento esquelético, que são denominados anomalias (CHAHOU, 2005). Houve elevado percentual de anomalias principalmente nos grupos C12 e CE, mas que também foram evidentes na concentração menor e intermediária do óleo, confirmando sua ação sobre a formação óssea (MELLO et al., 2000). Os resultados de pobre ossificação na cabeça para os grupos C12 e CE sugerem atraso no desenvolvimento dos fetos. No esterno, houve diferença para esternébras irregulares nos grupos C3 e C6 em relação ao grupo controle, também indicando retardo no desenvolvimento (DANTAS, 2016). De acordo com Lork (1997), os retardos no desenvolvimento ósseo estão relacionados à ausência de centros de ossificação em estruturas bilaterais ou na presença de forma e/ou tamanho claramente sugestivos de um estágio precoce de desenvolvimento.

Foi observado um aumento na incidência de anormalidades no esqueleto e pobre ossificação na cabeça conforme o aumento da dose, sendo indicativo de que este agente pode apresentar toxicidade de desenvolvimento mesmo na dose mais baixa (CHAHOU et al.; 1999). As alterações encontradas são variações caracterizadas por um atraso no desenvolvimento (CHAHOU et al., 2015), já as malformações, que são

representadas pela ausência parcial ou total de ossos importantes, encurtamentos, arqueamentos, assimetrias, fusões, fendas ou duplicidade (LORK, 1997), não foram observadas. Lemonica et al. (1996) não encontraram efeito significativo do tratamento com extrato aquoso de *Rosmarinus officinalis*, administrados para fêmeas do 6º ao 15º dia de gestação, no esqueleto de fetos. Nossos estudos mostram, pela primeira vez, resultados indicativos de atraso no desenvolvimento ósseo de fetos pelo OEA e seu composto majoritário.

Os índices reprodutivos das fêmeas tratadas não apresentaram diferença estatística significativa com o grupo controle, porém, a taxa de perdas pós-implantação demonstra uma tendência de aumento nos grupos que receberam o OEA, indicando que doses maiores devem ser testadas. Estudo verificou o mecanismo pelo qual o extrato aquoso de alecrim influencia a implantação do embrião, correlacionando a sua ingestão com possíveis alterações no desenvolvimento do embrião. O extrato foi administrado a ratas Wistar em duas doses: 260 e 1040 mg . kg<sup>-1</sup>, por via oral, do dia 1 ao dia 4 de gestação, uma vez ao dia. O tratamento com 260 mg . kg<sup>-1</sup> causou aumento significativo no número de embriões anômalos coletados do útero no dia 5, apresentando efeito tóxico no feto. No entanto, os embriões que conseguiram implantar apresentaram desenvolvimento normal. A administração de 1040 mg . kg<sup>-1</sup> do extrato não apresentou qualquer efeito embriotóxico. No entanto, no dia 5, um decréscimo de 40% do número de blastocitos presentes no útero foi observada. Este fato sugere que o tratamento com a dose mais elevada causou maior retenção de embriões no oviduto (DAMASCO e LEMONICA, 1999).

O composto majoritário identificado na análise cromatográfica foi o 1,8 cineol, um monoterpeno também identificado em outros estudos utilizando o óleo essencial de alecrim (OKOH et al., 2010; WALLER et al., 2016) e que pelo seu aroma e sabor agradáveis, é frequentemente utilizado em alimentos, fragrâncias e cosméticos, mas também é conhecido e estudado pelas suas características que lhe conferem bons resultados nas infecções do trato respiratório (JUERGENS; 2014) .

O peso do fígado, assim como para outros autores (DEBERSAC et al., 2001; GUERRA et al., 2009) aumentou nas fêmeas do grupo C12 e CE em comparação às do grupo CN. A ausência de alteração histológica significativa nos órgãos estudados e de sinais de toxicidade sistêmica como apatia e diarreia, indicam que nas doses e condições experimentais estudadas, o OEA e o 1,8 cineol não apresentaram toxicidade sistêmica na fêmeas (DANTAS, 2016). Como não foram evidenciadas alterações histopatológicas

indicativas de patologia, apenas tumefação hepatocelular, o aumento do fígado caracterizado por hipertrofia hepatocelular, é considerado uma resposta adaptativa frequente deste órgão quando exposto à xenobióticos (McGUIRE et al., 1986). O 1,8 cineol administrado na dose de 1000 mg.kg<sup>-1</sup> causou aumento da massa relativa e absoluta do fígado de fêmeas também para Caldas et al. (2016); e em um estudo conduzido por Kristiansen e Madsen (1995) tratando somente machos por 28 dias, o mesmo resultado foi observado. O peso do baço do grupo CE foi maior em relação ao grupo controle, porém trata-se de uma observação isolada, pois não foram realizadas dosagens de química clínica e esta alteração não está associada a alterações histopatológicas. Caldas et al. (2016) encontrou redução da massa absoluta deste órgão em machos tratados com 1000 mg.kg<sup>-1</sup>.

O presente estudo indica que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* nas doses 300 mg.kg<sup>-1</sup>, 600 mg.kg<sup>-1</sup> e 1200 mg.kg<sup>-1</sup> e seu composto majoritário 1,8 cineol (134,55 mg.kg<sup>-1</sup>) não causam toxicidade materna quando administrados do 6° ao 15° dia de gestação. No entanto, interferem no desenvolvimento fetal evidenciado pelo retardo no desenvolvimento esquelético observado em todos os grupos, sugerindo que as doses estudadas sejam evitadas em fêmeas durante o período gestacional.

## REFERÊNCIAS

ASHBY, R.; DAVIS, L.; DEWHURST, B.B.; ESPINAL, R.; PENN, R.N.; UPSHALL, D.G. Aspects of the teratology of cyclophosphamide (NSC-26271). **Cancer Treatment Reports**. v. 60, p. 477-482, 1976.

BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, p. 781-788, 2014.

BURFIELD, T. Safety of essential oils. **The International Journal of Aromatherapy**. v.10, n.1, 14p. 2000.

CALDAS, G.R.F.; LIMEIRA, M.M.F.; ARAÚJO, A.V.; ALBUQUERQUE, G.S.; SILVA-NETO, J.C.; SILVA, T.G.; COSTA-SILVA, J.H.; MENEZES, I.R.A.; COSTA, J.G.M.; WANDERLEY, A.G. Repeated-doses and reproductive toxicity studies of the monoterpene 1,8-cineole (eucalyptol) in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**. v. 96, p. 297-306, 2016.

CASSINA, M.; CAGNOLI, G.A.; ZUCCARELLO, D.; GIANANTONIO, E.D.; CLEMENTI, M. Human teratogens and genetic phenocopies. Understanding pathogenesis through human genes mutation. **European Journal of Medical Genetics**. v. 60, p. 22-31, 2017.



CHAHOUD, I. **Atlas of External and Skeletal Anomalies in Rats**. Berlin : Institute of Toxicology and Embryopharmacology FU, Leipzig : Pr & C GmbH, 1996. CD Room

CHAHOUD, I.; BUSCHMANN, J.; CLARK, R.; DRUGA, A.; FALKE, H.; FAQI, A.; HANSEN, E.; HEINRICH-HIRSCH, B.; HELLWIG, J.; LINGK, W.; PARKINSON, M.; PAUMGARTTEN, F.J.R.; PFEIL, R.; PLATZEK, T.; SCIALLI, A.R.; SEED, J.; STAHLMANN, R.; ULBRICH, B.; WU, X.; YASUDA, M.; YOUNES, M.; SOLECKI, R. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonisation. Report of the second workshop on the terminology in developmental toxicology Berlin, 27-28 august 1998. **Reproductive Toxicology**. v. 13, n. 1, p. 77-82, 1999.a

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

CHAHOUD, I.; TALSNESS, C.E.; WALTER, A.; GROTE, K. Postnatal investigation of prenatally induced effects on the vertebral column of rats reduces the uncertainty of classification of anomalies. **Reproductive Toxicology**. v.58, p. 15-23, 2015.

DAMASCO, D.C., LEMONICA, I.P. Embriotoxicity and anti-implantation effects of rosemary. (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. **Rev Bras Toxicol**, v. 12, p. 47-54, 1999.

DANTAS, A.S. **Estudo de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade do óleo essencial de *Origanum majorana***. Porto Alegre, 119p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2016.

DEBERSAC, P.; VERNEVAUT, M.F.; AMIOT, M.J.; SUSCHETET, M.; SIESS, M.H. Effects of a water-soluble extract of rosemary and its purified component rosmarinic acid on xenobiotic-metabolizing enzymes in rat liver. **Food and Chemical Toxicology**. v. 39, p. 109-117, 2001.

FARRAR, H.C.; BLUMER, J.L. Fetal effects of maternal drug exposure. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol**. v. 31, p. 525-547, 1991.

FOOTE, R.H.; CARNEY, E.W. The rabbit as a model for reproductive and developmental toxicity studies. **Reproductive Toxicology**. v. 14, p. 477-493, 2000.

GUERRA, M. O.; BORGES, N.B.E.; BELLEI, P.M.; ELIAS, M.A.F.; SILVEIRA, S.M.C.; PETERS, V.M. Intra uterine growth retardation in rats treated with essential oil of *Rosmarinus officinalis* Linn. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**. v.1, n.1, p.8-13, 2009.

HANSON, J.R. Rosemary, the beneficial chemistry of a garden herb. **Science Progress**. v.99, n.1, p. 83-91, 2016.

JUERGENS, U.R. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1,8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. **Drug Research**. v. 64, p. 638-646, 2014.

KRISTIANSEN, E.; MADSEN, C. Induction of protein droplet (alpha 2 muglobulin) nephropathy in male rats after short-term dosage with 1,8-cineole and 1-limonene. **Toxicol. Lett.** v. 80, p. 147-152, 1995.

LEMONICA, I.P.; DAMASCENO, D.C.; DI-STASI, L.C. Study of the embriotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 29, p. 223-227, 1996.

LORK, D. Evaluation of Skeleton. In: NEUBERT, D.; NERKER, H.J.; KAWASIGROC, T.E. Methods in prenatal toxicology, evaluation of embryotoxic effects in experimental animals. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 474p., 1997.

McGUIRE, E.J.; DiFONZO, C.J.; MARTIN, R.A.; IGLESIA, F.A. Evaluation of chronic toxicity and carcinogenesis in rodents with the synthetic analgesic, tilidine fumarate. **Toxicology**. v. 39, p. 149-163, 1986.

MELLO, JRB; LANGELOH, A.; HABERMEHL, G.; KREBS, H.; BASTOS, F.; ALVARES, F. Efeitos de extratos de *Nierembergia veitchii* (Hook) Solanaceae sobre a fertilidade de ratas e morfologia óssea dos fetos. **Ciência Rural**. v.30, n.3, p. 411-415, 2000.

OKOH, O.O.; SADIMENKO, A.P.; AFOLAYAN A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**. v.120, n.1 p. 308-312, 2010.

OXENDINE, S.L.; COWDEN, J.; HINTON, D.E.; PADILLA, S. Adapting themedaka embryo assay to a high-throughput approach for developmental toxicity testing. **Neurotoxicology**. v. 27, n. 5, p. 840-845, 2006.

PARK, D.; JEON, J.H.; SHIN, S.; JOO, S.S.; KANG, D.H.; MOON, S.H.; JANG, M.J.; CHO, Y.M.; KIM, J.W.; JI, H.J.; AHN, B.; OH, K.W.; KIM, Y.B. Green tea extract increases cyclophosphamide-induced teratogenesis by modulating the expression of cytochrome P-450 mRNA. **Reproductive Toxicology**. v 27, p. 79-84, 2009.

ROGERS, J.M.;CHERNOFF, N.; KEEN, C.L.; DASTON, G.P. Evaluation and interpretation of maternal toxicity in Segment II studies: issues, some answers, and data needs. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 207, p. 367-374, 2005.

SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104f. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS.

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

VIANNA, F.S.L.; KOWALSKI, T.W.; FRAGA, L.R.; SANSEVERINO, M.T.V.; SCHULER-FACCINI, L. The impact of thalidomide use in birth defects in Brazil. **European Journal of Medical Genetics**. v. 60, p.12-15, 2017.

WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; SILVA, A.L.; CASTRO, L.L.D.; CLEFF, M.B.; FERRAZ, V.; MEIRELES, M.C.; ZANETTE, R.; MELLO, J.R. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oil of Lamiaceae family. **Mycopathologia**. v. 181, p. 857-863, 2016.

WATSON, A.T.D.; PLANCHART, A.; MATTINGLY, C.J.; WINKLER, C.; REIF, D.M.; KULLMAN, S.W. Embryonic exposure to TCDD impacts osteogenesis of the axial skeleton in Japanese medaka, *Oryzias latipes*. **Toxicological Sciences**. v.11, p. 1-12, 2017.

ZUH, B.T. et al. Dietary administration of an extract from rosemary leaves enhances the liver microsomal metabolism of endogenous estrogens and decreases their uterotrophic action in CD-1 mice. **Carcinogenesis**. v.19,n.10, p.1821-1827, 1998.

## 5 CONCLUSÕES

O presente estudo traz as avaliações do óleo essencial de alecrim, uma substância promissora para o desenvolvimento de um novo fármaco, e seu composto majoritário, 1,8 cineol, em testes pré-clínicos de toxicidade reprodutiva. Os resultados indicam que:

- Não houve interferência do óleo essencial na fertilidade de ratos, machos e fêmeas, expostos antes e durante o acasalamento. O óleo essencial nas maiores doses estudadas (C6 e C12) causou o aumento do peso do fígado, sem alterações histopatológicas. Houve também, aumento do consumo de água por fêmeas. O seu composto majoritário, o 1,8 cineol na dose de  $134,55 \text{ mg.kg}^{-1}$ , diminuiu o número de filhotes nascidos por ninhada, indicando interferência no período de implantação, já que quando administrado durante a organogênese esses efeitos não foram observados e diminuiu o peso do testículo e epidídimo direitos.
- Não houve interferência do OEA no sistema reprodutivo da prole exposta durante o período gestacional e lactacional. Os fetos são afetados pelo tratamento materno com alterações nos reflexos de endireitamento e geotaxia (C6 e C12), porém evidenciados apenas nos dias iniciais de desenvolvimento (PPD 2 ao PPD 7). O teste de campo aberto demonstrou que o tratamento das mães aumentou a exploração na prole do grupo C3. Já o 1,8 cineol, interferiu no desenvolvimento reprodutivo dos machos, aumentando a testosterona sérica refletida em aumento do número de espermatozoides na prole.
- Os efeitos do óleo e composto majoritário (1,8 cineol) não alterou a fertilidade de ratas tratadas do 6º ao 15º dia de gestação e nenhum sinal de toxicidade foi observado nas fêmeas. Alterações esqueléticas foram observadas em todos os grupos com tratamento materno durante o período de desenvolvimento fetal, evidenciados por retardo no desenvolvimento esquelético, sugerindo que as doses estudadas sejam evitadas em fêmeas durante o período gestacional.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AFONSO, M. S.; SANT'ANA, L.S.; PINTO, J.P.A.N.; XIMENES, B. Atividade antioxidante e antimicrobiana do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em filés de tilápia (*Oreochromis ssp*) salgados, secos durante o armazenamento congelado. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.10, n.2, p.12-17, 2008.
- AGUILAR, F. et al. Scientific opinion of the panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission on the use of rosemary extracts as a food additive. **The EFSA journal**. v.721, p.1-29, 2008.
- AMIN, A.; HAMZA, A.A. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. **Life Sciences**, v.77, p.266–278, 2005.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia Para a Realização de Estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**. RESOLUÇÃO - RE Nº 90, DE 16 DE MARÇO DE 2004.
- BENNETI, F. **Intervenções na relação mãe-filhote e seus efeitos nas respostas comportamentais e endócrinas na vida adulta**. Tese de doutorado. UFRGS, 2005. 87p.
- BERNARDI, M.M. Exposição aos medicamentos durante o período perinatal. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada à medicina veterinária**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 781-788, 2014.
- CARDOSO, M. et al. **Óleos Essenciais**. Lavras: Editora UFLA, 2000. 42 p.
- CARVALHO Jr, R.N. **Obtenção de extrato de Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) por extração supercrítica: determinação do rendimento global, de parâmetros cinéticos e de equilíbrio e outras variáveis do processo**. Campinas, 151p. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos – Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2004.
- CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.13, n.2, p.203-208, 2011.
- CHAHOUD, I; FAQL, A.S. An optimized approach for the assessment of sexual behavior in male rats. **Reproductive Toxicology**, v. 12(6), p. 667–671, 1998.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I. et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.14, n.1, p.43-49, 2012.

- DAMASCO, D.C., LEMONICA, I.P. Embriyotoxicity and anti-implantation effects of rosemary. (*Rosmarinus officinalis* L.) extract in pregnant rats within preimplantation period. **Rev Bras Toxicol**, v. 12, p. 47-54, 1999.
- DANTAS, A.S. **Estudo de toxicidade reprodutiva e genotoxicidade do óleo essencial de *Origanum majorana***. Porto Alegre, 119p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), 2016.
- DOOLAEGE, E.H.A et al. Characterization of two unknown compounds in methanol extracts of Rosmary oil. **J. Agric. Food Chem.** v. 55, p. 7283-7287, 2007.
- DWECK, A.C. Toxicology of essential oils reviewed. **Personal Care**. p. 65-77, 2009.
- EBISUI, L.; FONTES, R.S.; LAPCHIK, V.B.V. Rato. In: **Cuidados e Manejo de Animais de Laboratório**. LAPCHIK, V.B.V; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. (orgs). São Paulo: Ed. Atheneu, 2009. p. 229 – 250.
- EL-DIN, R.A.S.; EL-SHAHAT, A.E. & ELMANSY, R.A. An electron microscopic study of the antifertility potential of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) in male albino rats. **Int. J. Morphol.** v.30, n.2, p.666-672, 2012
- EPA – Environmental Protection Agency. **Guidelines for Reproductive Toxicity Risk Assessment**. Federal Register 61(212):56274-56322. October, 1996.
- FAHIM, F.A.; ESMAT, A.Y.; FADEL, H.M. et al. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v.50, p.413–427, 1999.
- FAQI, A.S.; DALSENTER, P.R.; MERKER, H-J. et al. Reproductive toxicity and tissue concentrations of low doses of TCDD in male offspring rats exposed throughout pregnancy and lactation. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v.150, p. 383–92, 1998.
- FARIA, L.R.D. **Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) – atividades antiinflamatória e analgésica**. 2005. 66f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas/MG.
- FERLEMI, A.; KATSIKOUDI, A.; KONTOGIANNI, V.G.; KELLICI, T.F.; IATROU, G.; LAMARI, F.N.; TZAKOS, A.G.; MARGARITY, M. Rosemary tea consumption results to anxiolytic-and anti-depressant-like behavior of adult male mice and inhibits all cerebral area and liver cholinesterase activity; phytochemical investigation and in silico studies. **Chemico-Biological Interactions**. v. 237, p. 47-57, 2015.
- FERREIRA, L.G. et al. Does rosmarinic acid underestimate as an experimental cardiovascular drug? **Acta Cirúrgica Brasileira**. v.28 (supl.1), p.83-87, 2013.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**. v. 102, p. 898-904, 2007.

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

GRUENWALD, J.; BRENDLER, T.; JAENICKKE, C. (eds.) **Physicians Desk References (PDR) for herbal medicines**. Med. Econ. Co. New Jersey, 2000. 858p.

HARAGUCHI, H. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. **Planta Medica**, v.61, p.333-336, 1995.

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

HOLLEMBACH, C.B.; BING, R.S.; STEDILE, R.; MELLO, F.B.S.; SCHUCH, T.L.; RODRIGUES, M.R.A.; MELLO, F.B.; MELLO, J.R.B. Reproductive toxicity assessment of *Origanum vulgare* essential oil on male Wistar rats. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.43, p. 1295-1301, 2015.

HUSSAIN, A.I., ANWAR, F., CHATHA, S.A.S., et al. Rosmarinus officinalis essential oil: Antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 1070-1078, 2010.

IRKIN, R.; ABAY,S.; AYDIN,F. Inhibitory effects of some plant essential oil against *Arcobacter butzleri* and potential for rosemary oil as a natural food preservative. **Journal of Medicinal Food**. v.14, n.3, p.291-296, 2011.

JUERGENS, U.R. Anti-inflammatory properties of the monoterpene 1,8-cineole: current evidence for co-medication in inflammatory airway diseases. **Drug Research**. v. 64, p. 638-646, 2014.

JÚNIOR, J.R.V. Desinfecção de cones de guta-percha: potencial antibacteriano de um extrato vegetal comparado com agentes químicos. In: III Fórum de Gestão, Pesquisa, Ensino e Extensão, 2009, Montes Claros, Brasil. **Anais...** Montes Claros: Universidade Estadual de Montes Claros, 2009.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R. et al. Farmacologia e Toxicologia de Produtos Naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 891p.

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

LEMONICA, I.P., DAMASCENO, D.C., DI-STASI L.C. Study of the embryotoxic effects of an extract of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). **Revista Brasileira de Pesquisas Médicas e Biológicas**, v. 29, n. 2, p. 223-227, 1996.

LIU, T. et al. Application of ionic liquids based microwave-assisted simultaneous extraction of carnosic acid, rosmarinic acid and essential oil from *Rosmarinus officinalis*. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, p. 8480-8489, 2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008. 544 p.

MAISTRO, E.L.; MOTA, S.F.; LIMA, B.M. et al. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells *in vivo*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9 n. 4, p. 2113-2122, 2010.

MANNELLI, L.D.C.; MICHELI, L.; MARESCA, M.; CRAVOTTO, G.; BELLUMORI, M.; INNOCENTI, M.; MULINACCI, M.; GHELARDINI, C. Anti-neuropathic effects of *Rosmarinus officinalis* L. terpenoid fraction: relevance of nicotinic receptors. **Scientific Reports**. v. 6: 34832, 2016.

MELLO, M.S.C. **Avaliação da toxicidade reprodutiva do pesticida trifenil hidróxido de estanho (TPTH) em camundongos**. 2007. 131f. Tese de Doutorado em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro/RJ.

MEZIANE-ASSAMI, D. et al. Geographical differentiation of rosemary based on GC/MS and Fast HPLC analyses. **Food Analytical Methods**. v.6, n.1, p. 282-288, 2013.

NUSIER, M.K., BATAINEH, H.N., DARADKAH, H.M. Adverse effects of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) on reproductive function in adult male rat. **Experimental Biology and Medicine**, v. 232, p. 809 – 213, 2007.

OKOH, O.O. et al; SADIMENCO, A.P.; AFOLAYAN A.J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**. v.120, p. 308-312, 2010.

OOTANI, M.A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 4, n. 2, p. 162-174, 2013.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.



- SÁ, R.C.S., LEITE, M.N., OLIVEIRA, L.G. et al. Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male Wistar rats' organs and reproductive system. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 n. 3, p. 324-332, Jul./Set. 2006.
- SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104f. Tese de doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Porto Alegre, RS.
- SANTIN, R., MADRID, I.R., GIORDANI, C., ALVES G.H., et al. Toxicidade dérmica aguda do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*. In: XXII simpósio de plantas medicinais do Brasil. **Anais...** Bento Gonçalves: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, UFRGS, RS, 2012.
- SASAKI, K.; OMRI, A.E.; KONDO, S.; HANA, J.; ISODA, H. Rosmarinus officinalis polyphenols produce anti-depressant like effect through monoaminergic and cholinergic functions modulation. **Behavioural Brain Research**. v. 238, p. 86-94, 2013.
- SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Rio de Janeiro, v.16, p. 38-43, 2000.
- SILVA JR, A.A. **Essentia Herba – Plantas bioativas**, Volume I. EPAGRI, Florianópolis, 2003. 441 p.
- SILVA, A.M.O. **Efeito dos compostos fenólicos do alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na inflamação aguda e sobre marcadores de estresse oxidativo de ratos diabéticos**. São Paulo, 133p. Tese (Doutorado em Nutrição Experimental) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo (USP), 2012.
- SILVA, I.M.C. et al. Avaliação da citotoxicidade de diferentes extratos de alecrim. In: XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS, 2007, Pelotas, Brasil. **Anais...**Pelotas : Universidade Federal de Pelotas, UFPel, 2007.
- SILVA, J.; FONSECA, M.B. Estudos toxicológicos no ambiente e na saúde humana. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003. 424p.
- SILVA, M.S.A.; SILVA, M.A.R.; HIGINO, J.S. et al. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-240, 2008.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P; GOSMANN, G. MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2000. 891p.
- SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. 1102p.

SOUSA, M.P.; MATOS, M.E.O.; MATOS, F.J.A. et al. **Constituintes químicos de plantas medicinais brasileiras**. Imprensa Universitária/Edições UFC, Fortaleza, 1991. 416p.

TISSERAND, R. Essential oil safety II – metabolism, neurotoxicity, reproductive toxicity. **The International Journal of Aromatherapy**. v.7, n.4, 4p. 1996.

VEIGA JR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.308-313, 2008.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A.C.. Plantas Mediciniais: Cura segura? **Química Nova (Impresso)**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VICENZI, M; SILANO, M.; VICENZI, A.; MAIALETTI, F; SCAZZOCCHIO, B. Constituents of aromatic plants: eucalyptol. **Fitoterapia**. v. 73, p. 269-275, 2002.

WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; SILVA, A.L.; CASTRO, L.L.D.; CLEFF, M.B.; FERRAZ, V.; MEIRELES, M.C.; ZANETTE, R.; MELLO, J.R. In vitro susceptibility of *Sporothrix brasiliensis* to essential oil of Lamiaceae family. **Mycopathologia**. v. 181 (11-12), p. 857-863, 2016.

WANG, Q.L. et al. Acute and 30-day oral toxicity studies of administered carnosic acid. **Food and Chemical Toxicology**. v.50, p.4348-4355, 2012.

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

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

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

## ANEXO A



**U F R G S**  
UNIVERSIDADE FEDERAL  
DO RIO GRANDE DO SUL

**PRÓ-REITORIA DE PESQUISA**

Comissão De Ética No Uso De Animais



**CARTA DE APROVAÇÃO**

Comissão De Ética No Uso De Animais analisou o projeto:

**Número:** 26988

**Título:** Avaliação da Toxicidade Reprodutiva do Óleo Essencial de Rosmarinus officinalis L. em Ratos Wistar

**Pesquisadores:**

**Equipe UFRGS:**

JOAO ROBERTO BRAGA DE MELLO - coordenador desde 16/04/2014  
FERNANDA BASTOS DE MELLO - pesquisador desde 16/04/2014  
Andrea dos Santos Dantas - Aluno de Doutorado desde 16/04/2014  
Luciana Dalazen dos Santos - Aluno de Doutorado desde 16/04/2014  
IZABELA DE PAULA PEREIRA - desde 16/04/2014

**Equipe Externa:**

Mario Carlos de Araújo Meireles - pesquisador desde 16/04/2014  
Marlete Brum Cleff - pesquisador desde 16/04/2014  
Fernanda Bastos de Mello - coordenador desde 16/04/2014

**Comissão De Ética No Uso De Animais aprovou o mesmo , em reunião realizada em 14/07/2014 - Sala 308 - Prédio da Faculdade de Educação - Porto Alegre - RS, em seus aspectos éticos e metodológicos, para a utilização de 360 ratos Wistar, sendo 90 machos e 270 fêmeas, de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.**

Porto Alegre, Quinta-Feira, 31 de Julho de 2014

*Cristiane Matte*

CRISTIANE MATTE  
Vice Coordenador da comissão de ética