



ARTIGO

Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos Wistar por meio do teste de micronúcleos

Clarissa Boemler Hollenbach^{1*}, Mariani Fogaça do Santos², Fabíola Peixoto da Silva Mello¹,
Luiza da Gama Osório¹, Tatiana Larissa Schuch², Luciana Machado da Silva²,
Maria Regina Alves Rodrigues³, Fernanda Bastos de Mello⁴ e João Roberto Braga de Mello⁵

Recebido: 9 de abril de 2013 Recebido após revisão: 16 de maio de 2014 Aceito: 5 de junho de 2014
Disponível on-line em <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/2597>

RESUMO: (Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos Wistar por meio do teste de micronúcleos). No presente trabalho o potencial genotóxico do óleo essencial do orégano foi testado por meio do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos Wistar (*Rattus norvegicus*). Grupos de 5 ratos machos e 5 fêmeas foram tratados com o óleo essencial, por via oral, em tratamento agudo, em três doses: 2000, 1000 e 500 mg.kg⁻¹ respectivamente, um controle negativo utilizando o veículo da administração do óleo, Tween 80, um controle positivo utilizando ciclofosfamida e um controle positivo utilizando os compostos majoritários encontrados no óleo testado. A citotoxicidade foi avaliada pela relação entre eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (EPC/ENC) e a frequência de eritrócitos micronucleados. Os resultados revelaram através da proporção de EPC/ENC, que o óleo essencial do orégano e o controle positivo com os compostos majoritários causaram uma leve toxicidade na medula óssea de ratos Wistar. Não houve um aumento estatisticamente significativo (Kruskal-Wallis $p > 0,01$) de frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos nas três doses do óleo essencial do orégano, mas aumentou a frequência de EPCMN do controle positivo com os compostos majoritários induzindo assim genotoxicidade nos eritrócitos dos ratos. Com base nos resultados é possível sugerir que através deste teste citogenético o óleo essencial do orégano utilizado neste experimento, não apresenta atividade genotóxica nas doses utilizadas.

Palavras-chave: óleo de orégano, genotoxicidade, medula óssea, roedores.

ABSTRACT: (Evaluation of the genotoxic potential of the essential oil of *Origanum vulgare* L. Wistar rats by means of the test of micronucleus). In this work the genotoxic potential of oregano essential oil was tested using the micronucleus test in bone marrow of Wistar rats (*Rattus norvegicus*). Groups of 5 male and 5 female rats were treated with the essential oil orally, in acute treatment, in three doses: 2000, 1000 and 500 mg.kg⁻¹ respectively, a negative control using the vehicle of administration, Tween 80, using a positive control cyclophosphamide and a positive control using the majority compounds found in the oil tested. Cytotoxicity was assessed by the ratio of polychromatic erythrocytes and normochromatic erythrocytes (PCE/NCE) and the frequency of micronucleated erythrocytes. The results revealed by the ratio of PCE/NCE, the essential oil of oregano and positive control compounds majority caused a slight toxicity in the bone marrow in Wistar rats. There was a statistically significant increase (Kruskal-Wallis test $p > 0.01$) frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes in 3 doses of essential oil of oregano, but increased the frequency of the positive control PCEMN with the majority compounds thus inducing genotoxicity in erythrocytes of rats. Based on the results is possible to suggest that through this cytogenetic test the essential oil of oregano used in this experiment, does not have genotoxic activity at the doses used.

Key words: oregano oil, genotoxicity, bone marrow, rodents.

INTRODUÇÃO

O interesse pelas terapias com produtos naturais vem crescendo atualmente, bem como a demanda do seu consumo. Inúmeros estudos com plantas medicinais têm demonstrado que seus óleos essenciais possuem diversas propriedades, entre elas: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, larvicida, vermífuga e antiinflamatória. (Ferronato *et al.* 2007, Figueiredo *et al.* 2006, Costa *et al.* 2005, Sousa *et al.* 2004).

Do orégano (*Origanum vulgare* L.) é possível extrair um óleo essencial que apresenta em torno de 34 compostos ativos, sendo que os compostos terpênicos

como carvacrol, timol, gama terpineno e *p*-cimeno podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo (Bampidis *et al.* 2005).

Diversos estudos comprovaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes químicos frente a várias espécies de fungos filamentosos como *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. ochraceus*, *A. parasiticus*, *Penicillium italicum* e *Fusarium oxysporum* (Buchanam & Shepherd 1981, Paster *et al.* 1990, Tantaoui-elaraki *et al.* 1993, Daouk *et al.* 1995), assim como frente a espécies de *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (Manohar *et al.* 2001, Chami *et al.* 2004, Cleff *et al.* 2007, Cleff *et al.* 2010).

1. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias (PPGCV), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, RS, Brasil

2. Médica Veterinária Autônoma.

3. Departamento de Química Orgânica IQG, Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). Pelotas, RS, Brasil.

4. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA). Porto Alegre, RS, Brasil

5. Departamento de Farmacologia, ICBS, UFRGS. Porto Alegre, RS, Brasil

* Autor para contato. E-mail: clarissa.hollenbach@gmail.com

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

Existem relatos de que alguns óleos essenciais tiveram efeito antígeno-tóxico (Ipek *et al.* 2005, Aydin *et al.* 2005). E apenas um relato comprovando o efeito genotóxico em medula óssea *in vivo* do timol e carvacrol (Azirak & Rencuzogullari 2008).

Os efeitos genotóxicos do timol foram investigados em linfócitos periféricos humanos tratados nas concentrações de 25, 50, 75, por 24 e 48 h, o timol diminuiu o Índice mitótico na maior concentração (100 mg/mL) sem efeito dose-dependente tendo um efeito significativamente clastogênico (Buyukleyla & Rencuzogullari 2009).

Baseados nos potenciais terapêuticos e utilização clínica do óleo essencial de orégano, os estudos toxicológicos são indispensáveis e complementares. Optou-se por avaliar a genotoxicidade do referido óleo essencial através do teste de micronúcleos em medula óssea de ratos, devido à ausência de dados de genotoxicidade desta planta, por este sistema-teste.

MATERIAL E MÉTODOS

Material vegetal

Orégano (*Origanum vulgare*) foi adquirido de distribuidor comercial, importado pela Ricex Importação e Exportação LTDA., de São Paulo, Brasil. O orégano seco é originário do Peru pertencente à marca Oro Verde. O material vegetal utilizado era composto somente por folhas do orégano, sendo estas embaladas em sacos de papel pardo revestidos internamente com uma camada plástica e armazenados em local fresco, seco e livre da exposição solar.

Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial do orégano foi extraído pelo método denominado destilação com arraste de vapor no laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, utilizando o equipamento desenvolvido pelo engenheiro mecânico Edgar Witkowski. Utilizou-se 1 kg de folhas secas de orégano por vez e deste volume de planta foi extraído 0,6 mL de óleo essencial, em média. Foram necessários aproximadamente 30 mL de óleo para a realização deste ensaio.

Análise cromatográfica do óleo essencial

As análises cromatográficas do óleo essencial do orégano foram realizadas no laboratório do Instituto de Química da UFRGS, em cromatógrafo gasoso com detector de massas, injetor split/splitless, GC/MS Shi-

madzu QP-5050A, visando à identificação dos principais constituintes químicos. Utilizou-se como método de ionização o impacto eletrônico (EI) com energia de ionização de 70 eV. A coluna capilar utilizada foi OV-5 (metil silicone com 5% de grupos fenila) com 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm de espessura de filme de fase estacionária e 30 m de comprimento, nas seguintes condições cromatográficas: 60-240 °C, a 3 °C/min, a 10 °C/min até 280 °C; (Td=180 °C; T_{inj}=240 °C; split=1:10). Inicialmente, 1 µL de soluções de concentrações variadas de padrões foram injetadas no cromatógrafo para obtenção do tempo de retenção de padrões referentes aos principais compostos presentes na amostra de orégano (α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, α-terpineno, terpinoleno, linalol, 4-terpineol, α-terpineol, timol e carvacrol). Posteriormente foi preparada uma solução de óleo a 5000 ppm em hexano, que foi injetada no cromatógrafo e comparada em relação aos tempos de retenção dos padrões na coluna cromatográfica (Rodrigues *et al.* 2004).

Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos, com idade inicial de sete semanas, hípidos, provenientes do Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) da UFRGS, com condições constantes de umidade, temperatura (21 °C ± 2) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas (das 8h às 20h). O projeto de pesquisa intitulado “Estudo da genotoxicidade de óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar” recebeu aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, sob o número 2008067.

Seleção das concentrações da substância teste (Teste Preliminar)

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

Devido à ausência de dados toxicológicos do óleo essencial do orégano (DL50), que poderiam nortear o estabelecimento das doses de estudo, foi utilizada como dose máxima tolerada (DMT) a dose de 2000 mg / kg (OECD 1997).

Formação dos Grupos Experimentais (Teste Definitivo)

Foram constituídos 6 grupos experimentais, formados por 10 animais cada (5 machos e 5 fêmeas), sendo que os animais foram selecionados aleatoriamente. Utilizou-se um Grupo Controle Negativo (GC-) tratado com o veículo empregado na dissolução do óleo essencial de orégano,

0,001 mL de Tween 80 em 100 mL de água destilada (10 mL.kg⁻¹) e três grupos tratados com o óleo essencial do orégano em emulsão de Tween 80: GD I tratado com a concentração de 2000 mg.kg⁻¹; GD II tratado com 1000 mg.kg⁻¹ e GD III tratado com 500 mg.kg⁻¹ de óleo essencial. Também foram formados dois grupos controle positivos: Grupo Controle Positivo – Ciclofosfamida (GC+) tratado com 25 mg.kg⁻¹ de Genuxal® e Grupo Controle Positivo – Compostos Majoritários (GC+ CM) tratado com a associação dos compostos fenólicos do orégano, timol e 4- terpineol, na concentração de 2000 mg.kg⁻¹.

Tratamento dos animais

Os animais experimentais foram tratados diariamente por via oral, com sonda oro-gástrica flexível. Todos os animais foram tratados com volume idêntico, correspondendo a 10 mL.kg⁻¹. Os animais pertencentes aos Grupos I, II e III, GC- e GC+CM foram tratados durante 3 dias consecutivos. O GC+ foi tratado durante dois dias consecutivos, iniciando a dosificação a partir do segundo dia de tratamento dos demais grupos.

Preparação das lâminas

Os animais foram eutanasiados 24 horas após o último tratamento em câmara de CO₂. Após a eutanásia, através de anti-sepsia com álcool 70% ambos os fêmures de cada animal foram retirados.

A medula óssea de cada fêmur foi extraída com auxílio de uma seringa de 1 mL previamente preenchida com soro fetal bovino, para realização do esfregaço e confecção da lâmina de análise, uma lâmina para cada fêmur, totalizando duas lâminas por animal. As lâminas foram secas ao ar, durante aproximadamente 24 horas, fixadas em metanol, por dez minutos. Vinte e quatro horas após a fixação, as lâminas foram coradas com uma solução contendo 5% de GEMSA® e 95% de solução tampão. Posteriormente a marcação inicial e antes da microscopia, as lâminas foram codificadas para realização de “análise cega”.

Análise das lâminas

As lâminas foram analisadas em microscópio óptico com aumento de mil vezes (objetiva de imersão). A análise foi feita em 1000 eritrócitos policromáticos (EPC) por lâmina, totalizando 2000 EPCs por animal. O número de células micronucleadas (EPCs com micronúcleos) foi registrado e a relação entre o número de EPC/ ENC tam-

bém foi determinada em cada lâmina lida, analisando-se 500 eritrócitos por lâmina (totalizando 1000 eritrócitos por animal).

Análise estatística

A metodologia utilizada para análise estatística incluiu os testes: análise de variância não-paramétrica de Kruskal-Wallis, análise de variância de uma via (ANOVA) e o teste Qui-quadrado para as variáveis qualitativas, no caso de p<0,05 realizou-se o Teste Tukey.

RESULTADOS

Análise cromatográfica

Os picos cromatográficos demonstrados na figura 1 representam os compostos do óleo essencial de orégano em maior quantidade na amostra analisada. Os compostos 4-terpineol e timol se apresentaram como majoritários, conforme representado pelos picos 15 e 22.

Número de Eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN)

O número de EPCMN contados em esfregaço sanguíneo da medula óssea dos ratos machos e fêmeas são mostrados nas figuras 2 e figura 3, respectivamente. Foram contados 1000 EPCs por medula de rato, totalizando 2000 eritrócitos por animal, dos quais foi contado o número de células micronucleadas.

Na análise estatística, através da Análise de Variância Não – Paramétrica de Kruskal-Wallis, verificou-se que houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, sendo que GC+ e GC+CM diferiram dos demais grupos testados. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os sexos (ANOVA, p>0,05).

Relação EPC/ENC

A relação de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos são demonstrados na tabela 1, para machos, e tabela 2, para fêmeas, determinados em cada lâmina de esfregaço sanguíneo, analisando-se 500 eritrócitos por lâmina (totalizando 1000 eritrócitos por animal) nos grupos experimentais.

Para realizar a análise estatística usou-se a variável rel_EPC_ENC, que é resultante da divisão da média EPC pela média ENC. Realizando a Análise de Variância (ANOVA) observa-se que não existe efeito da interação

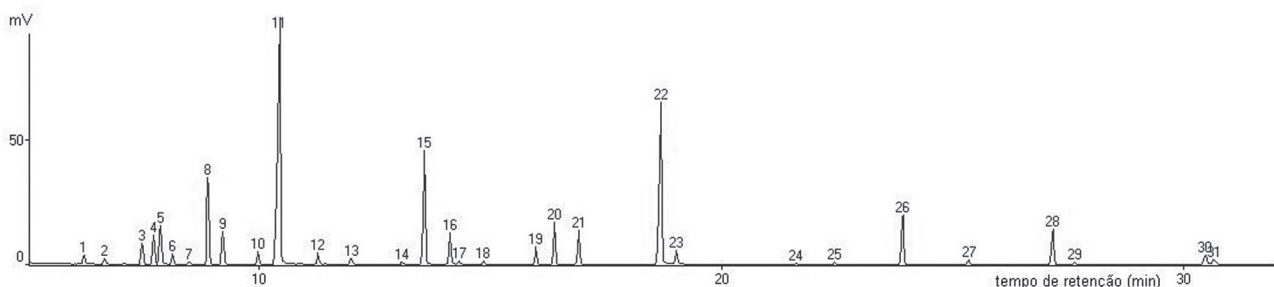


Figura 1. Cromatograma do íon total (GC/MS) da amostra do óleo essencial de orégano, preparado em solução de 1.000 mg.L⁻¹, em hexano.

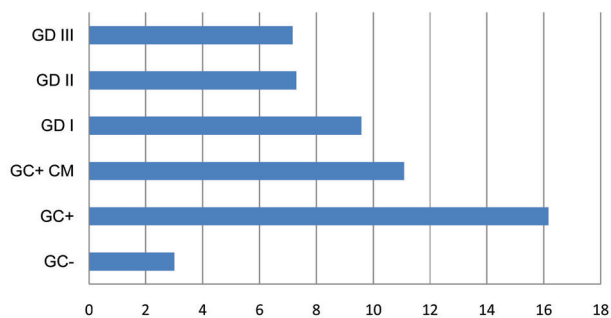


Figura 2. Número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN), contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, machos tratados em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), (GC), (GC+) e (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).

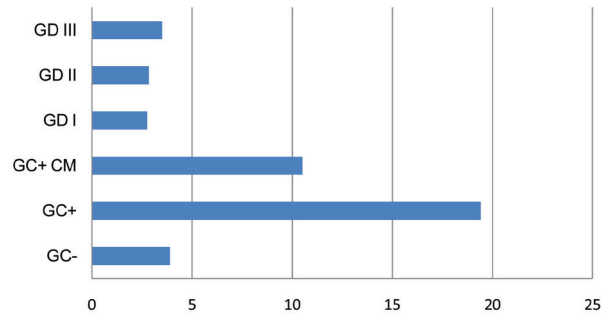


Figura 3. Número de eritrócitos policromáticos com micronúcleos (EPCMN), contados em medula óssea dos ratos, totalizando 1000 por animal, fêmeas tratadas em três doses: 2000 (GD I), 1000 (GD II) e 500 mg.kg⁻¹ (GD III), (GC-), (GC+) e (GC+ CM). Os valores representam a média dos animais por grupo (n = 5).

entre tratamento e sexo e não foi observada diferença de médias entre sexo.

DISCUSSÃO

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

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

No entanto, o controle positivo compostos majoritários foi diferente do controle negativo no número de EPCMN, mostrando efeito genotóxico. Este resultado está de acordo com Karpouhtsis e colaboradores (1998), que revela-

ram que entre os compostos fenólicos extraídos do óleo de orégano (*Origanum vulgare*) e avaliados pelo teste de mutação e recombinação somática em *Drosophila* apenas o timol exibe atividade genotóxica. E com os resultados de Fletcher e colaboradores (2005) que avaliaram óleos de *Melaleuca angustifolia* e também do principal componente do óleo, o 4-terpineol, através do teste de AMES, os resultados mostraram que o 4-terpineol só apresentou toxicidade na maior dose utilizada.

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

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

A proporção EPC entre os outros eritrócitos, no presente estudo, revelou uma diminuição na contagem de

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

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

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

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

eritrócitos policromáticos em relação ao controle negativo, em todas as doses testadas, em machos e fêmeas, apesar de não representar significância estatística. Estes resultados revelam que as doses testadas do óleo essencial de orégano podem ter causado uma leve citotoxicidade na medula óssea dos animais e a ausência de sinais clínicos de toxicidade durante o estudo reforçam este resultado, já que a substância deprimiu a medula óssea sem causar sinais clínicos desta depressão. O grupo controle positivo com compostos majoritários do óleo essencial do orégano também causou uma leve citotoxicidade na medula óssea. Isto vem confirmar que alguns compostos, como o timol, utilizado isoladamente podem causar toxicidade, como está descrito na literatura.

Alguns estudos mostraram evidências negativas do potencial genotóxico *in vivo* do eugenol, principal componente do óleo essencial do cravo-da-índia (Maura *et al.* 1989, Abraham 2001).

Ipek e colaboradores (2005) avaliaram os efeitos genotóxicos e antígenotóxicos do óleo essencial de *Origanum onites* L. e de carvacrol, através do teste de AMES Salmonela. A atividade mutagênica foi inicialmente rastreada usando linhagens *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100, com ou sem ativação metabólica. Não foi encontrada mutagenicidade no óleo de ambas as linhagens, pelo contrário, ambas as amostras inibiram fortemente a mutagenicidade. Mezzoug e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antimutagênica e mutagênica pelo teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, do óleo essencial de *Origanum compactum*. Não observaram aumento no número de mutações somáticas com o óleo essencial testado.

O óleo essencial do *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* foi analisado juntamente com seus principais constituintes, carvacrol e timol, quanto à atividade genotóxica por Karpouhtsis e colaboradores (1998), revelando que entre os compostos fenólicos extraídos do óleo de orégano e avaliados pelo teste de mutação e recombinação somática em *Drosophila* apenas o timol exibe atividade genotóxica.

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

Fundamentados nos resultados alcançados neste estudo conclui-se que o óleo essencial do orégano não induziu genotoxicidade nos eritrócitos medulares de ratos Wistar nas concentrações avaliadas. Este teste de genotoxicidade do óleo essencial do orégano vem contribuir para as pesquisas com produtos naturais, com mais um dado para a segurança deste óleo essencial. No entanto, ainda são necessários outros testes de genotoxicidade e de toxicidade, para garantir a segurança do óleo essencial de orégano.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K. 2001. Antigenotoxicity of trans-anethole and eugenol in mice. *Food Chem Toxicol*, 39: 493-498.
- AYDIN, S., BASARAN, A. A. & BASARAN, N. 2005. The effects of thyme volatiles on the induction of DNA damage by the heterocyclic amine IQ and mitomycin C. *Mutat Res-Genetic Toxicol Environ Mutagen*, 581: 43-53.
- AZIRAK, S., RENCUZOGULLARI, E. 2008. The *in vivo* genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environ Toxicol*, 23(6): 728-735.
- BAMPIDIS, V.A., CHRISTODOULOU, V., FLOROU-PANERI, P., CHRISTAKI, E., CHATZPOULOU, P.S., TSILIGIANNI, T. & SPAIS, A.B. 2005. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *British Poultry Science*, 46: 595-601.
- BUCHANAN, R. L. & SHEPHERD, A. J. 1981. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by timol. *J. Food Sci.*, 46: 976-977.
- BUYUKLEYLA, M. & RENCUZOGULLARI, E. 2009. Effects of thymol on sister chromatid exchange, chromosome aberration and micronucleus in human lymphocytes. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72: 3-947.
- CHAMI, N., CHAMI, F., BENNIS, S., TROUILLAS, J. & REMMAL, A. 2004. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *Braz J Infect Dis.*, 8: 217-226.
- CLEFF, M.B., SILVA, G.M., MEINERZ, A.R.M., MADRID, I.M., MARTINS, A.A., FONSECA, A.O., NASCENTE, P.S., MEIRELES, M.C.A. & MELLO, J.R.B. 2007. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. *Rev. Vet. Zoot.*, 2(14): 164-168.
- CLEFF, M. B., MEINERZ, A.R.M., XAVIER, M., SCHUCH, L.F., MEIRELES, M.C.A., RODRIGUES, M.R. & MELLO, J.R.B. 2010. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Braz. J. Microbiol.*, 41: 116-123.
- COSTA, J.G.M., RODRIGUES, F.F.G., ANGÉLICO, E.C., SILVA, M.R., MOTA, M.L., SANTOS, N.K.A., CARDOSO, A.L.H. & LEMOS, T.L.G. 2005. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzigium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Rev. Bras. de Farmacogn.*, 15(4): 304-309.
- COSTA, R. M. A. & MENK, C. F. M. 2000. Biomonitoramento de mutagênese ambiental. *Biotecnologia: ciência e desenvolvimento*, 3: 24-26.
- DAOUK, R.K., DAGHER, S. & SATTOUT, E. 1995. Antifungal activity of essential oil of *Origanum syriacum* L. *J. Food Prot.*, 58: 147-149.
- FERRONATTO, R., MARCHESAN E.D., PEZENTI, E., BEDNARSKI, F. & ONOFRE S.B. 2007. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2): 224-230.
- FLETCHER, J. P., CASSELA, J.P., HUGHES, D. & CASSELA, S. 2005. An evaluation of the mutagenic potential of commercially available tea tree oil in the United Kingdom. *Int J of Aromatherapy*, 15: 81-86.
- FIGUEIREDO, R.O., DELACHIAVE, M.E.A. & MING, L.C. 2006. Reguladores vegetais na produção de biomassa e teor de óleos essenciais em *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf, em diferentes épocas do ano. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 8: 31-35.
- IPEK, I., ZEYINOGLU, H., OKAY, S., TUYLU, B.A., KURKCOGLU, M. & BASER, K.H.C. 2005. Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93: 551-556.
- KARPOUHTSIS, I. PARDALI, E., FEGGOU E., KOKKINI, S., SCOURAS, Z. G. & MAVRAGANI-TSIPIDOU, P. 1998. Insecticidal and Genotoxic Activities of Oregano Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, 46: 1111-1115.
- MANOHAR, V., INGRAM, C., GRAY, J., TALPUR, N., ECHARD, B., BAGCHI, D. & PREUSS, H. 2001. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and cellular biochemistry*, 228: 111-117.

- MAURA, A., PINO, A. & RICCI, R. 1989. Negative evidence in vivo of DNA-damaging, mutagenic and chromosomal effects of eugenol. *Mutat Res*, 227: 125-129.
- MEZZOUG, N., ELHADRI, A., DALLOUH, A., AMKISS, S., SKALI, N.S., ABRINI, J., ZHIRI, A., BAUDOUX, D., DIALLO, B., EL JAZIRI, M. & IDAOMAR, M. 2007. Investigation of the mutagenic and anti-mutagenic effects of *Origanum compactum* essential oil and some of its constituents. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 629: 100-110.
- OECD – Guideline for The Testing of Chemicals. Method 474 “*Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*” (Adopted: 21st July 1997).
- PASTER, N., JUVENT, B.J. & SHAAYA, E. 1990. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on mould and foodborne bacteria. *Lett. Applied Microbiol.*, 11: 33-37.
- RIBEIRO, L.R. 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, L.R., SALVADORI, D.M.F. & MARQUES, E.K. (Eds.) *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Editora Ulbra. p.173-200.
- RODRIGUES, M. R. A., KRAUSE, L. C., CAMARÃO, E. B. SANTOS, J.G., DARIVA, C. & OLIVEIRA, J.V. 2004. Chemical composition and extraction a yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. *J. Agric. Food Chem.*, 52: 3042-3047.
- SOUZA, O.V., SOARES JÚNIOR, D.T., DEL-VECHIO, G., MATOSINHOS, R.G., GATTASS, C.R. & KAPLAN, M. A. C. 2004. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. *Rev. Bras. Farmacogn.*, 14: 11-14.
- TANTAOU-ELARAKI, A., FERHOUT, H. & ERRIFI, A. 1993. Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. *J. Essen. Oils Res.*, 5: 535-543.
- UMBUZEIRO, G. A., VARGAS, V.M.F., FELZENSZWALB, I., HENRIQUES, J.A.P. & VARANDA, E. 2004. Teste de mutação reversa com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames, Ensaio *Salmonella*/microsoma. In: Série Documentos SBMCTA, 1. Disponível on-line em:< http://www.sbmcta.org.br/_img/_documentos/8abf3bb568d1c7ba57cd3ff7a22880c.pdf>