

Trabajos originales



Acta de Otorrinolaringología & Cirugía de Cabeza y Cuello

www.revista.acorl.org.co



Trabajos originales

Cribado virtual de metabolitos secundarios de *Origanum vulgare* y mejorana frente a NaV1.7 como anestésicos promisorios asociados a la vía neurosensitiva auditiva

Virtual screening of secondary metabolites of *Origanum vulgare* and marjoram against NaV1.7 as promising anesthetics associated with the auditory neurosensory pathway

Carlos Arturo Vélez-Duncan*, Alejandro Uribe-Escobar**, Rafael Pineda-Alemán***, Neyder Contreras-Puentes****, Antistio Alviz-Amador*****.

* Otorrinolaringólogo y otólogo. Vestibulum, Grupo de Investigación. ORCID: 0000-0003-2853-7566.

** Residente de otorrinolaringología, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia. ORCID: 0000-0002-8617-5279.

*** Pharmacology and Therapeutics Research Group, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia. ORCID: 0000-0002-4259-1780.

**** Pharmacology and Therapeutics Research Group, Universidad de Cartagena; GINUMED, Corporación Universitaria Rafael Núñez. Cartagena, Colombia. ORCID: 0000-0003-0974-8894.

***** Pharmacology and Therapeutics Research Group, Universidad de Cartagena. Cartagena, Colombia. ORCID: 0000-0002-7324-2487

Forma de citar: Vélez-Duncan CA, Uribe-Escobar A, Pineda-Alemán R, Contreras-Puentes N, Alviz-Amador A. Cribado virtual de metabolitos secundarios de *Origanum vulgare* y mejorana frente a NaV1.7 como anestésicos promisorios asociados a la vía neurosensitiva auditiva. Acta otorrinolaringol. cir. cabeza cuello. 2023;51(1): 29-34. DOI.10.37076/acorl.v51i1.676

INFORMACIÓN DEL ARTÍCULO

Historia del artículo:

Recibido: 30 de junio de 2022
Evaluado: 08 de marzo de 2023
Aceptado: 14 de marzo de 2023

Palabras clave (DeCS):

Origanum, otolaringología, canal de sodio activado por voltaje NAV1.7, ácido clorogénico, luteolina, apigenina.

RESUMEN

Introducción: en general, el orégano es una planta medicinal usada en los pueblos de la costa Caribe colombiana para tratar afecciones del aparato respiratorio y el oído externo debido a su potencial efecto antiinflamatorio, analgésico y antiséptico; sin embargo, esto no se ha validado mediante ensayos clínicos. **Objetivo:** realizar un cribado virtual basado en el acoplamiento molecular de metabolitos secundarios identificados en el *Origanum vulgare* y mejorana frente al receptor Nav1.7 para evaluar el potencial efecto anestésico a nivel del oído externo. **Método:** el presente es un estudio in silico con un enfoque de cribado virtual por acoplamiento molecular, para lo cual se usó el software AutoDock Vina y para las predicciones farmacocinéticas

Correspondencia:

Carlos Arturo Vélez-Duncan
E-mail: carlosvelezduncan1979@gmail.com
Dirección: Carrera 19A No. 29 B 130 Cartagena
Teléfono celular: 3188270845

se usó la herramienta en línea SwissADME del Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.sib.swiss>). Adicionalmente, se evaluó la toxicidad in silico de las moléculas utilizando el servidor GUSAR-Online. *Resultados:* de las 99 moléculas que fueron evaluadas por acoplamiento molecular se evidenció que las mayores afinidades con respecto al canal Nav1.7 fueron el ácido clorogénico, la rutina, la luteolina, el luteosido y la apigenina, donde se presentaron energías de afinidad con el sitio de unión en el poro central del canal a valores entre $-5,40 \pm 0,00$ a $-5,57 \pm 0,06$ kcal/mol; de estos, de acuerdo con el análisis ADMET y GUSAR, solo el ácido clorogénico, la luteolina y la apigenina son buenos candidatos potenciales para fármacos anestésicos ya que cumplen con las cinco reglas de Lipinski. *Conclusión:* con base en los estudios fitoquímicos de *O. vulgare* y mejorana que han reportado los metabolitos secundarios presentes en los extractos de estas plantas, se evidenció en el presente estudio in silico su acoplamiento al canal Nav1.7 expresado en la vía neurosensitiva del oído. Se demostró, además, que el ácido clorogénico, la luteolina y la apigenina podrían ser potenciales fármacos anestésicos locales para las afecciones del oído.

ABSTRACT

Key words (MeSH):

Origanum, otolaryngology, NAV1.7 voltage-gated sodium channel, chlorogenic acid, luteolin, apigenin.

Introduction: In general, oregano is a medicinal plant used in rural areas of the colombian Caribbean coast to treat conditions of the respiratory system and external ear due to its potential anti-inflammatory, analgesic and antiseptic effect, however, it has not been validated through clinical trials. *Objective:* To carry out a virtual screening based on molecular coupling of secondary metabolites identified in *Origanum vulgare* and *marjoram* against the Nav1.7 receptor to evaluate the potential anesthetic effect at the level of the external ear. *Method:* This is an in-silico study with a virtual molecular docking screening approach, for which the AutoDock Vina software was used and the Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.sib.swiss>) online tool SwissADME was used for pharmacokinetic predictions. Additionally, the in-silico toxicity of the molecules was evaluated using the GUSAR-Online server. *Results:* Of the 99 molecules that were evaluated by molecular coupling, it was shown that the highest affinities with respect to the Nav1.7 channel were chlorogenic acid, rutin, luteolin, luteoside and apigenin, where affinity energies were presented with the binding site in the central pore of the channel at values between -5.40 ± 0.00 to -5.57 ± 0.06 kcal/mol, which according to the ADMET and GUSAR analysis, only chlorogenic acid, luteolin and apigenin are good potential candidates for anesthetic drugs complying with the 5 rules of Lipinsky. *Conclusion:* Based on the phytochemical studies of *O. vulgare* and *marjoram* that have reported the secondary metabolites present in the extracts of these plants, their coupling to the Nav1.7 channel expressed in the neurosensory pathway of the ear was evidenced in this in-silico study. It was also shown that chlorogenic acid, luteolin and apigenin could be potential local anesthetic drugs for ear conditions.

Introducción

En nuestra región, el uso de plantas medicinales continúa siendo una tradición y una opción terapéutica considerada por muchos de nuestros pacientes y familiares, incluso por encima de la medicina alopática. Esto está dado, tal vez, por la fácil adquisición de estas, su bajo costo y la creencia en la población de ser inocuas. Incluso la Organización Mundial de la Salud (OMS) se ha pronunciado respecto a este tema y ha manifestado que el uso de las plantas medicinales constituye una terapia natural, con menos probabilidades de toxicidad, efectivas y costo-efectivas; sin embargo, no se encuentra en las bases de datos disponibles con estudios me-

todológicamente estructurados que respalden su uso en los diferentes escenarios (1).

En el área de la otorrinolaringología, el uso de plantas medicinales surge de tradiciones regionales y que han permanecido en la sociedad generación tras generación. Ejemplo de esto es el manejo de las patologías del oído externo y medio con el orégano y sus derivados. A pesar de que existen reportes en los que se menciona la actividad antimicrobiana y analgésica de algunas especies de estas plantas (2, 3), no existen ensayos clínicos que demuestren su eficacia en estas patologías. Únicamente contamos con estudios *in vivo* que demuestran su efecto antiinflamatorio a nivel del oído en modelos animales (4).

A partir de esto, la implementación de metodologías *in silico* constituye en la actualidad una herramienta eficaz en el descubrimiento y el diseño racional de fármacos que optimicen la búsqueda de candidatos con mayor especificidad, lo que aumenta las propuestas de moléculas prometedoras con destino al tratamiento de alteraciones relacionadas con diferentes órganos, incluyendo el oído. Incluso la audición humana se hace relevante debido a que la descripción de muchos mecanismos moleculares aún no está totalmente establecida, por lo cual la búsqueda de candidatos terapéuticos de cualquier patología es una perspectiva presente y futura con el fin de cubrir alternativas para los pacientes.

Por ello, en este estudio se realizó un abordaje sobre la regulación de la vía neurosensorial a nivel molecular asociada con el dolor, la cual está dada por el bloqueo de los canales de sodio dependientes de voltaje. Se ha reportado la expresión de canales tipo Nav1.6 y Nav1.7 a nivel del oído como los blancos farmacológicos potenciales para la búsqueda de nuevos anestésicos con mayor afinidad por estas dianas (5), lo que ha conllevado el estudio de agentes anestésicos de fuentes naturales como *Origanum vulgare* y *majorana* por ser las especies más predominantes en Colombia que se asocian con el uso de medicina tradicional por las comunidades para aliviar dolores e infecciones auditivas que nos permitan validar ese saber ancestral en el futuro.

Metodología

Diseño del estudio

El presente es un estudio *in silico* con un enfoque de cribado virtual por acoplamiento molecular de fármacos o fitoquímicos con propiedades adecuadas de similitud de fármacos, accesibilidad sintética, farmacocinéticas y toxicológicas.

Inicialmente, se realizó una búsqueda de metabolitos secundarios presentes en plantas del género *Origanum* (*O. vulgare* y *O. majorana*). Para la selección de los principales reportes se utilizaron términos clave como: *O. vulgare* AND *O. majorana* AND metabolites AND LC-MS OR GC-MS.

Selección y preparación de moléculas y proteínas

Las moléculas se descargaron de la base de datos de PubChem (6) y se identificaron mediante su código CID (PubChem Compound Identification). La minimización de las estructuras se realizó utilizando el algoritmo de Open Babel tools y se aplicaron los campos de fuerza MMFF94, usando gradientes conjugados y un algoritmo de descenso más pronunciado que incluye 2000 pasos (7). Paralelamente, se empleó la estructura proteica del canal Nav1.7 humano (código *protein data bank* [PDB]: 5EK0, resolución de 3,53 Å) (8). Previamente, la estructura se refinó a través de un modelo por homología utilizando el servidor en línea Swiss Model del Bioinformatic Swiss Institute (<https://swissmodel.expasy.org/>) (9), con lo que se obtuvo un nuevo modelo PDB. Posteriormente, se identificaron los sitios de unión de los ligandos teniendo en cuenta estudios preliminares y la revisión de literatura.

Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular sobre el canal Nav1.7 se llevó a cabo por triplicado con AutoDock Vina (10). El espacio de cuadrícula central fue de $x = -49.477 \text{ \AA}$, $y = -25.317 \text{ \AA}$, $z = 4540 \text{ \AA}$ con $x = 10,41 \text{ \AA}$, $y = 7,66 \text{ \AA}$ y $z = 11,31 \text{ \AA}$. Cada acoplamiento molecular se simuló con una exhaustividad de ocho y determinando 10 conformaciones, basado en la energía libre y desviación de la media cuadrática (*Root Mean Square Deviation*, RMSD) entre conformaciones. Los resultados de la mejor conformación se registraron en formato pdbqt y luego se convirtieron en formato PDB. Se realizó un promedio de energía libre con desviación estándar y su respectiva pose; asimismo, se analizaron las interacciones y tipos de unión del complejo diana-ligando mediante el visualizador LigPlot+ versión 2.2 (11).

Predicción de propiedades *in silico*

La predicción de farmacocinética y similitud de fármacos para los metabolitos de mayor afinidad se realizó mediante la herramienta en línea SwissADME del Swiss Institute of Bioinformatics (<http://www.sib.swiss>) (12). Se hizo el análisis de algunos parámetros farmacocinéticos como: inhibición sobre el citocromo P450 (CYP450), absorción gastrointestinal, permeabilidad de la barrera hematoencefálica, unión a las glicoproteínas P y constantes de permeabilidad Kp; así como de parámetros de predicción de similitud farmacológica como las reglas de Lipinski y la biodisponibilidad. Adicionalmente, se evaluó la toxicidad *in silico* de las moléculas utilizando el servidor GUSAR-Online (13).

Consideraciones éticas

El presente estudio es *in silico*, es decir, es un trabajo descriptivo de tamizaje de moléculas con potencial actividad farmacológica y, por tanto, se encuentra en la fase preclínica, con lo cual no amerita estudios con seres humanos y no aplican las consideraciones éticas.

Resultados

De las 99 moléculas que fueron evaluadas por acoplamiento molecular, se evidenció que las mayores afinidades con respecto al canal Nav1.7 fueron ácido clorogénico, rutina, luteolina, luteosido y apigenina, en las cuales se presentaron energías de afinidad con el sitio de unión en el poro central del canal a valores entre $-5,40 \pm 0,00$ a $-5,57 \pm 0,06$ kcal/mol (**Tabla 1 y Figura 1**). Se estableció que los residuos de aminoácidos clave en la unión fueron M185, M220, Thr431, L432 y Thr462, en los que se mostró la presencia de interacciones de enlaces de hidrógeno e hidrofóbicas.

De todos los metabolitos secundarios analizados mediante las predicciones ADME empleando SwissADME y GUSAR online, solo el ácido clorogénico, la luteolina y la apigenina cumplieron con las cinco reglas de Lipinski para ser candidatos a fármacos potenciales ya que demuestran

Tabla 1. Resultados del acoplamiento molecular entre metabolitos secundarios identificados en *O. vulgare* y *O. majorana* frente al receptor Nav1.7 expresado en la vía neurosensible del oído

Ligando	Docking score (kcal/mol)	Puentes de hidrógeno	Interacciones hidrofóbicas
Ácido clorogénico	-5,57 ± 0,06	Met185 (A), Thr217 (A), Met430 (B)	Met220 (A), Thr431 (B), Leu432 (B), Thr462 (B), Met465 (B), Ile466 (B), Leu677 (C)
Rutina	-5,53 ± 0,12	Met185 (A), Thr217 (A), Thr462 (B)	Thr186 (A), Leu187 (A), Ile221 (A), Met220 (A), Thr431 (B), Leu432 (B), Ile466 (B), Leu677 (C), Thr921 (B), Met955 (B)
Luteolina	-5,50 ± 0,00	Met185 (A), Thr217 (A), Met430 (B)	Thr186 (A), Met220 (A), Leu432 (B), Thr462 (B), Met465 (B)
Luteosido	-5,43 ± 0,06	Met185 (A), Thr217 (A), Thr676 (C)	Thr186 (A), Met220 (A), Ile221 (A), Leu432 (B), Thr462 (B), Met465 (B), Ile466 (B), Leu677 (C),
Apigenina	-5,40 ± 0,00	Thr217 (A)	Met185 (A), Met220 (A), Val216 (A), Leu432 (B), Thr462 (B), Ile466 (B)
Lidocaína	-4,30 ± 0,0	-	Thr186 (A), Leu187 (A), Thr217 (A), Met220 (A), Leu432 (B), Thr921 (D)

A: Cadena A; B: Cadena B; C: Cadena C; D: Cadena D. Fuente: elaboración propia de los autores.

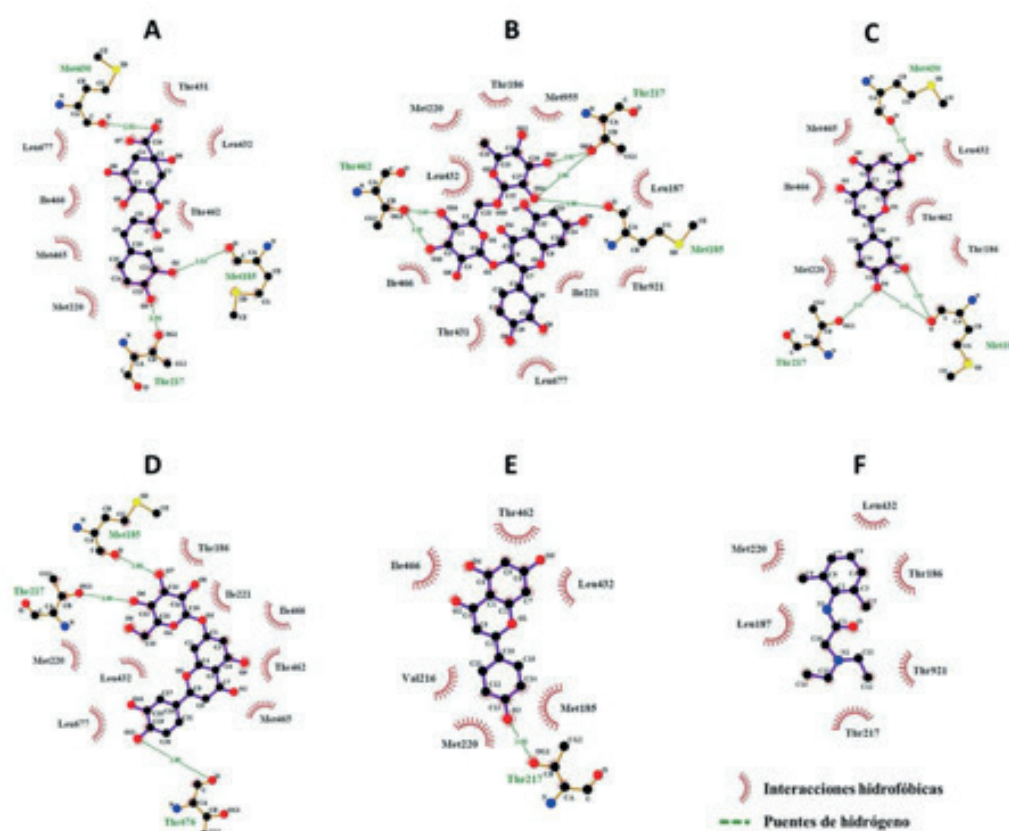


Figura 1. Interacciones representativas de moléculas presentes en *O. vulgare* y *O. majorana* contra el canal de sodio Nav1.7. [Nota: por favor indicar la fuente de esta figura]

A. Ácido clorogénico | B. Rutina | C. Luteolina | D. Luteosido | E. Apigenina | F. Lidocaína (anestésico local de referencia).

potencial de seguridad por determinar dosis tóxicas con cantidades que van desde los 897 mg/kg por vía oral y de forma aguda (Tabla 2).

Discusión

Durante mucho tiempo, las alternativas terapéuticas basadas en la etnofarmacología han llevado al estudio de productos

naturales promisorios contra diversas patologías subyacentes. Dos de estas especies de plantas distribuidas en diversas regiones del mundo corresponden a *O. vulgare* y *O. majorana*, las cuales muestran una variada actividad biológica en torno a su potencial antimicrobiano, antioxidante, antiinflamatorio, sedante y anestésico (2, 14-17). El amplio reporte de acción sobre dianas biológicas está establecido por la presencia de metabolitos pertenecientes a flavonoides, taninos,

Tabla 2. Predicción de propiedades ADMET y similaridad de metabolitos secundarios de *O. vulgare* y *O. majorana*

Compuestos	ADME							Toxicidad	Similaridad	
	AGI	BHE	P-gp	Log Kp (cm/s)	Citocromo				OAR (mg/kg-OECD)	Lipinski
					1A2	2D6	3A4			
Ácido clorogénico	Baja	No	No	-8,76	No	No	No	3097 (V)	Sí	0,11
Rutina	Baja	No	Sí	-10,26	No	No	No	2953 (V)	No	0,17
Luteolina	Alta	No	No	-6,25	Sí	Sí	Sí	1684 (IV)	Sí	0,55
Luteosido	Baja	No	Sí	-9,87	No	No	No	2004 (V)	No	0,17
Apigenina	Alta	No	No	-5,80	Sí	Sí	Sí	896.6 (IV)	Sí	0,55

AGI: Absorción gastrointestinal; BHE: Barrera Hematoencefálica; OAR: Oral aguda en ratas; OECD: [falta el significado de la sigla]; V; IV: [falta el significado de las siglas]. [Nota: falta la fuente de esta tabla]

glicósidos y terpenos, los cuales se resaltan por su presencia en diferentes partes de las plantas.

En la identificación de los compuestos de *O. vulgare* y *O. majorana* se detectan moléculas bioactivas como ácido clorogénico, apigenina, luteolina, carvacrol, timol, *p*-cimeno, terpineol, luteolin-O-glucósido, γ -terpineno, hesperetina, quercetina, kaempferol, entre muchos compuestos (2, 15, 18). Adicionalmente, el uso tradicional de estas plantas ha tenido aplicación a nivel ótico en el tratamiento de molestias como procesos inflamatorios a nivel de otitis media, *tinnitus* y dolor de oído, en los que suelen emplearse macerados o extractos mezclados con aceites vegetales para aliviar los síntomas (19-21). Asimismo, algunos metabolitos, como el carvacrol, se han probado en la respuesta inflamatoria y en modelos de edema inducido en oído (22) y se ha vislumbrado el papel del carvacrol y el timol en la inhibición de microorganismos vinculados en el desarrollo de otitis en animales (23). Por otro lado, se ha establecido que extractos acuosos de *O. vulgare* presentan actividad antinociceptiva, específicamente como analgésico en modelos de ratas comparados con controles expuestos a formalina. Adicionalmente, se establece que la respuesta analgésica puede estar vinculada con la presencia de carvacrol, el cual reporta una acción inhibitoria contra las prostaglandinas y una asociación antiinflamatoria en un posible efecto hipernociceptivo (14).

Estudios realizados por Ghelardini y colaboradores indicaron la actividad anestésica local de aceites esenciales de *O. majorana* y *Pimpinella anisum* a nivel *in vitro* e *in vivo*, describiendo que el α -terpineol y el anetol redujeron las contracciones evocadas eléctricamente a nivel del nervio frénico de rata a valores de 0,001-1 $\mu\text{g/mL}$ (24). En otros modelos de animales, como *Rhamdia quelen*, se ha evaluado la capacidad anestésica de aceites esenciales de *O. majorana*, en los que se describe que a concentraciones $\geq 200 \mu\text{L}^{-1}$ se producía el efecto anestésico, así como se produjo una disminución de la pérdida iónica (Na^+ , K^+ y Cl^-) cuando se realizó la exposición a los aceites esenciales (25). De los metabolitos presentes en las plantas de *Origanum* spp. se destaca que el ácido clorogénico es capaz de modular la actividad *in vitro* sobre la conductancia en los canales de K^+ y los canales iónicos sensibles al ácido (ASIC) presentes en neuronas sensoriales primarias. Además, en estos estudios se

ha evidenciado que la administración *in vivo* de ácido clorogénico en modelos de ratas induce el control regulativo sobre la excitabilidad neuronal del trigémino, al igual que se demostró una inhibición en la descarga neuronal del núcleo caudal del trigémino espinal, y que fue comparable por la respuesta de anestésicos locales como la lidocaína, empleada en el estudio (26).

De los resultados aquí reportados se destaca que cinco metabolitos (ácido clorogénico, rutina, luteolina, luteosido y apigenina; -5,57, -5,53, -5,50, -5,43, -5,40 kcal/mol, respectivamente) presentaron energía de afinidad menor a las del referente lidocaína (-4,30 kcal/mol), como se destacó en la **Tabla 1**; esto podría vislumbrar el posible mecanismo de acción de estos compuestos presentes en el órgano que los relaciona con el efecto analgésico y/o anestésico local, por el cual la medicina popular los emplea para el alivio del dolor de oído.

Conclusiones

Existe evidencia en la literatura sobre la actividad farmacológica del *O. vulgare* y mejorana que, además, está validada en estudios *in vitro* desde patologías de interés en otorrinolaringología como las afecciones del oído externo. Desde estudios fitoquímicos se han reportado metabolitos secundarios presentes en los extractos de esta planta, que en el presente estudio *in silico* se acoplaron al canal Nav1.7 expresado en la vía neurosensible del oído. Se demostró que el ácido clorogénico, la luteolina y la apigenina podrían ser potenciales fármacos anestésicos para el manejo de afecciones del oído.

Recomendaciones

Es menester avanzar hacia la prueba en modelos animales de cada uno de estos compuestos, sobre todo el ácido clorogénico, la luteolina y la apigenina, ya que en predicciones ADMET y de toxicidad, como se presentó en la **Tabla 2**, también mostraron un buen perfil de drogabilidad; posteriormente, se podría llevarlos a estudios en humanos debido a que son compuestos promisorios para el tratamiento del dolor en otorrinolaringología.

REFERENCIAS

- Soria N, Ramos P. Uso de plantas medicinales en la Atención Primaria de Salud en Paraguay: algunas consideraciones para su uso seguro y eficaz. *Mem. Inst. Invest. Cienc. Salud.* 2015;13(2):8-17.
- Bouyahya A, Chamkhi I, Benali T, Guaouguou FE, Balahbib A, El Omari N, et al. Traditional use, phytochemistry, toxicology, and pharmacology of *Origanum majorana* L. *J Ethnopharmacol.* 2021;265:113318. doi: 10.1016/j.jep.2020.113318
- Rezaie A, Jafari B, Mousavi G, Nazeri M, Ebadi A, Ahmاده C, et al. Comparative Study of Sedative, Pre-Anesthetic and Anti-Anxiety Effect of *Origanum majorana* Extract with Diazepam on Rats. *Res J Biol Sci.* 2011;6(11):611-4. doi: 10.3923/rjbsci.2011.611.614
- Chuang LT, Tsai TH, Lien TJ, Huang WC, Liu JJ, Chang H, et al. Ethanolic Extract of *Origanum vulgare* Suppresses Propionibacterium acnes-Induced Inflammatory Responses in Human Monocyte and Mouse Ear Edema Models. *Molecules.* 2018;23(8):1987. doi: 10.3390/molecules23081987
- Fryatt AG, Vial C, Mulheran M, Gunthorpe MJ, Grubb BD. Voltage-gated sodium channel expression in rat spiral ganglion neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2009;42(4):399-07. doi: 10.1016/j.mcn.2009.09.001
- Kim S, Thiessen PA, Bolton EE, Chen J, Fu G, Gindulyte A, et al. PubChem Substance and Compound databases. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D1202-13. doi: 10.1093/nar/gkv951
- O'Boyle NM, Banck M, James CA, Morley C, Vandermeersch T, Hutchison GR. Open Babel: An open chemical toolbox. *J Cheminform.* 2011;3:33. doi: 10.1186/1758-2946-3-33
- Ahuja S, Mukund S, Deng L, Khakh K, Chang E, Ho H, et al. Structural basis of Nav1.7 inhibition by an isoform-selective small-molecule antagonist. *Science.* 2015;350(6267):aac5464. doi: 10.1126/science.aac5464
- Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(W1):W296-303. doi: 10.1093/nar/gky427
- Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. *J Comput Chem.* 2010;31(2):455-61. doi: 10.1002/jcc.21334
- Laskowski RA, Swindells MB. LigPlot+: multiple ligand-protein interaction diagrams for drug discovery. *J Chem Inf Model.* 2011;51(10):2778-86. doi: 10.1021/ci200227u
- Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: a free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep.* 2017;7:42717. doi: 10.1038/srep42717
- Lagunin A, Zakharov A, Filimonov D, Poroikov V. QSAR Modelling of Rat Acute Toxicity on the Basis of PASS Prediction. *Mol Inform.* 2011;30(2-3):241-50. doi: 10.1002/minf.201000151
- Afarineshe Khaki MR, Pahlavan Y, Sepehri G, Shebani V, Pahlavan B. Antinociceptive Effect of Aqueous Extract of *Origanum vulgare* L. in Male Rats: Possible Involvement of the GABAergic System. *Iran J Pharm Res.* 2013;12(2):407-13.
- De Falco E, Mancini E, Roscigno G, Mignola E, Tagliatalata-Scafati O, Senatore F. Chemical composition and biological activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* L. under different growth conditions. *Molecules.* 2013;18(12):14948-60. doi: 10.3390/molecules181214948
- Lombrea A, Antal D, Ardelean F, Avram S, Pavel IZ, Vlaia L, et al. A Recent Insight Regarding the Phytochemistry and Bioactivity of *Origanum vulgare* L. Essential Oil. *Int J Mol Sci.* 2020;21(24):9653. doi: 10.3390/ijms21249653
- Tsuchiya H. Anesthetic Agents of Plant Origin: A Review of Phytochemicals with Anesthetic Activity. *Molecules.* 2017 Aug 18;22(8):1369. doi: 10.3390/molecules22081369
- Taamalli A, Arráez-Román D, Abaza L, Iswaldi I, Fernández-Gutiérrez A, Zarrouk M, et al. LC-MS-based metabolite profiling of methanolic extracts from the medicinal and aromatic species *Mentha pulegium* and *Origanum majorana*. *Phytochem Anal.* 2015;26(5):320-30. doi: 10.1002/pca.2566
- Mahmoudian-Sani MR, Hashemzadeh-Chaleshtori M, Asadi-Samani M, Luther T. A Review of Medicinal Plants for the Treatment of Earache and Tinnitus in Iran. *Int Tinnitus J.* 2017;21(1):44-49. doi: 10.5935/0946-5448.20170009
- Gómez-Estrada H, Díaz-Castillo F, Franco-Ospina L, Mercado-Camargo J, Guzmán-Ledezma J, Medina JD, et al. Folk medicine in the northern coast of Colombia: an overview. *J Ethnobiol Ethnomed.* 2011;7:27. doi: 10.1186/1746-4269-7-27
- Cardona LM, Cardona LM, Díaz APS, Corrales JAP. Uso de plantas medicinales en enfermedades otorrinolaringológicas. *Rev Cuba Otorrinolaringol y Cirugía Cabeza y Cuello.* 2020;4(3):1-13.
- Silva FV, Guimarães AG, Silva ER, Sousa-Neto BP, Machado FD, Quintans-Júnior LJ, et al. Anti-inflammatory and anti-ulcer activities of carvacrol, a monoterpene present in the essential oil of oregano. *J Med Food.* 2012;15(11):984-91. doi: 10.1089/jmf.2012.0102
- Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Najar B, Pistelli L, Mancianti F. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils against Pathogens Responsible for Otitis Externa in Dogs and Cats. *Medicines (Basel).* 2017;4(2):21. doi: 10.3390/medicines4020021
- Ghelardini C, Galeotti N, Mazzanti G. Local anaesthetic activity of monoterpenes and phenylpropanes of essential oils. *Planta Med.* 2001;67(6):564-6. doi: 10.1055/s-2001-16475
- da Cunha JA, Scheeren C, Salbego J, Gressler LT, Madaloz LM, Bandeira Junior G, et al. Essential oils of *Cunila galioides* and *Origanum majorana* as anesthetics for *Rhamdia quelen*: Efficacy and effects on ventilation and ionoregulation. *Neotrop Ichthyol.* 2017;15(1):e160076. doi: 10.1590/1982-0224-20160076
- Kakita K, Tsubouchi H, Adachi M, Takehana S, Shimazu Y, Takeda M. Local subcutaneous injection of chlorogenic acid inhibits the nociceptive trigeminal spinal nucleus caudalis neurons in rats. *Neurosci Res.* 2018;134:49-55. doi: 10.1016/j.neures.2017.11.009