

## Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*

[Antifungal activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Malassezia pachydermatis*]

R. Santin<sup>1</sup>, C. Giordani<sup>2</sup>, I.M. Madrid<sup>3</sup>, C.B. Matos<sup>2</sup>, R.A. Freitag<sup>2</sup>, M.C.A. Meireles<sup>2</sup>,  
M.B. Cleff<sup>2</sup>, J.R.B. Mello<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Programa de pós-graduação – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – Porto Alegre, RS

<sup>2</sup>Programa de pós-graduação – Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS

<sup>3</sup>Prefeitura Municipal de Pelotas – Pelotas, RS

### RESUMO

Objetivou-se com este estudo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis*. As folhas secas de *O. vulgare* foram adquiridas de distribuidor comercial com certificado de qualidade e origem e encaminhadas para extração do óleo essencial e cromatografia. Para realização do teste *in vitro*, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (CLSI M27A3) com modificações para fitofármacos e *M. pachydermatis*. O óleo essencial de orégano foi testado nas concentrações de 28 a 0,87mg/mL diluído em caldo Sabouraud com 1% de tween 80. Todos os isolados foram testados em duplicata. Na análise cromatográfica do óleo essencial, foram identificados 12 compostos, sendo timol,  $\alpha$ -terpineno e 4-terpineol os compostos majoritários. A CIM e a CFM dos 42 isolados de *M. pachydermatis* variaram de  $\leq 0,87$  a 7mg/mL, com valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 1,18 e 3,28mg/mL, respectivamente. Com este estudo foi possível concluir que *M. pachydermatis* é sensível ao óleo essencial de orégano mesmo em concentrações baixas. Dessa maneira, o óleo essencial de orégano apresenta-se como promissor na bioprospecção de novos fármacos para o tratamento das otites e dermatites na clínica de pequenos animais.

Palavras-chave: cão, extratos vegetais, leveduras, orégano, suscetibilidade

### ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of essential oil of *Origanum vulgare* against clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. The dried leaves of *O. vulgare* were purchased from a commercial distributor with certified quality and origin and referred for essential oil extraction and chromatography. The technique for *in vitro* testing was microdilution (CLSI M27A3) with modifications to phytochemicals and *M. pachydermatis*. The essential oil of *O. vulgare* was tested at concentrations from 28 to 0.87mg/mL in Sabouraud broth diluted with 1% of tween 80. All isolates were tested in duplicate. In the chromatographic analysis of the essential oil 12 compounds were identified, and thymol,  $\alpha$ -terpinene, 4-terpineol were the major compounds. The MIC and the MFC of the 42 isolates of *M. pachydermatis* ranged from  $\leq 0.87$  to 7mg/mL with MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> values of 1.18 and 3.28 mg/mL, respectively. With this study it was concluded that *M. pachydermatis* is sensible to *O. vulgare* essential oil even at low concentrations. Thus, the essential oil of *O. vulgare* is presented as bioprospecting in the promising new drugs for the treatment of otitis and dermatitis in small animal clinic.

Keywords: dog, plant extracts, yeasts, oregano, susceptibility

---

Recebido em 6 de fevereiro de 2013

Aceito em 1 de outubro de 2013

E-mail: seminhavet@yahoo.com.br

## INTRODUÇÃO

A utilização de plantas na terapêutica acompanha a evolução da humanidade, de forma que o uso popular desses recursos no tratamento de doenças é descrito há muitos anos, mesmo sem confirmação científica. É importante salientar que cerca de 80% da população de baixa renda não tem acesso à assistência farmacêutica. Assim, as plantas medicinais representam uma fonte viável para o tratamento de enfermidades (Veiga Junior et al. 2005).

Atualmente, políticas federais de incentivo às pesquisas, visando ao uso seguro e eficaz de fitoterápicos, têm sido implementadas. Nesse sentido, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) organizou um manual para divulgação de diversas espécies com potencial terapêutico bem descrito e aceito cientificamente, principalmente para serem utilizadas pelo SUS (Sistema Único de Saúde) (Brasil, 2011).

No contexto atual, destaca-se o *Origanum vulgare* L., popularmente conhecido como orégano, uma planta aromática utilizada principalmente na culinária que tem seu valor medicinal reconhecido. Além das folhas, usadas no tratamento popular, o óleo essencial tem demonstrando eficácia em pesquisas, principalmente como antimicrobiano (Lambert et al., 2001; Manohar et al. 2001; Souza et al. 2005; Cleff et al., 2010a; Cleff et al., 2010b).

A malasseziose está entre as micoses mais diagnosticadas em pequenos animais, sendo a *Malassezia pachydermatis* de grande importância nas otites e dermatites (Nobre et al., 1998; Nascente et al., 2004). O gênero *Malassezia* possui 14 espécies, todas lipodependentes (Cabañes et al., 2011), com exceção da *M. pachydermatis*, única não-lipodependente e a mais envolvida na casuística dermatológica da clínica de pequenos animais (Campbell et al., 2010). Alterações no microambiente do conduto auditivo, como aumento da temperatura, umidade e substrato, favorecem o aumento do número de células e a passagem da levedura da forma comensal para a parasitária ou patogênica. O mesmo acontece nas dermatites, em que o desequilíbrio na imunidade do hospedeiro é um dos principais fatores desencadeantes da malasseziose (Nobre et al., 1998; Nascente et al., 2004). Além disso, tem sido demonstrada a

importância dessa levedura em saúde pública, visto que a mesma já foi isolada e associada à formação de biofilmes, que podem atuar como fonte de infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos, principalmente neonatos (Canizzo et al., 2007). A resistência de *M. pachydermatis* aos antifúngicos comumente utilizados no tratamento da enfermidade já foi demonstrada por Fera et al. (2009), Jesus et al. (2011) e Nijima et al. (2011).

Tendo em vista a grande importância do uso de plantas medicinais na Veterinária e o papel de *M. pachydermatis* como um dos principais agentes de otites externas e dermatites secundárias em cães, objetivou-se, com este trabalho, avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* frente a isolados clínicos de *M. pachydermatis*.

## MATERIAL E MÉTODOS

Para o estudo da atividade antifúngica, o *O. vulgare* (orégano) foi adquirido de distribuidor comercial com certificado de qualidade e origem. Para obtenção do óleo essencial, as folhas secas foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger, segundo a Farmacopeia Brasileira IV, durante 4 horas. Depois, o óleo obtido foi seco com sulfato de sódio anidro p.a, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração até a utilização.

Realizou-se a análise cromatográfica em equipamento CG/FID (Schimadzu, modelo 2010) equipado com uma coluna de sílica DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm), com temperatura inicial de 40°C, ocorrendo um aumento na taxa de 2°C min<sup>-1</sup> até atingir 145°C. A partir dessa temperatura, a taxa foi de 10°C min<sup>-1</sup> até atingir 280°C, permanecendo nessa temperatura por 10min; Td = 280°C; Tinj = 280°C; Tcol = 40°C; Split = 1:50.

Foram preparadas soluções do óleo a 5.000mg L<sup>-1</sup> em hexano e dos padrões cromatográficos a 40mg L<sup>-1</sup> ( $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, terpinoleno, linalol, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, timol e carvacrol), das quais foram injetadas no cromatógrafo em volume de 1µL. Os constituintes foram identificados por comparação entre o tempo de retenção dos padrões e da amostra.

Para realização do teste do óleo essencial de *O. vulgare*, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo de acordo com o documento M27A3 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com modificações para fitofármacos e *M. pachydermatis* (Cleff *et al.*, 2010a).

Foram estudados 42 isolados de *M. pachydermatis* provenientes de casos clínicos de otites (n=35) e de dermatites (n=7) em cães que se encontravam estocados na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da UFPel. Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens (48h) em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. As colônias foram suspensas em solução salina estéril, homogeneizadas e ajustadas em espectrofotômetro com comprimento de onda 530nm e transmitância entre 60-65%. A partir dessa solução, foi realizada uma diluição de 1:50 em solução salina estéril e, em seguida, uma diluição de 1:20 em meio Sabouraud líquido, a qual foi dispensada em alíquotas de 100µL nos poços das microplacas. O óleo essencial de orégano foi testado nas concentrações de 28 a 0,87mg/mL diluído em caldo Sabouraud com 1% de Tween 80. Todos os isolados foram testados em duplicata.

Depois de preenchidas, as microplacas foram incubadas a 35°C por 72h para realização da leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Posteriormente, realizou-se a transferência de 10µL de cada poço para placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, as quais foram incubadas a 35°C por 72h para leitura da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Os dados da CIM e CFM foram expressos pela média das duplicatas e relacionados como valores em que 50% (CIM<sub>50</sub>) e 90% (CIM<sub>90</sub>) dos isolados foram inibidos. *M. pachydermatis* foi classificada como sensível (S) quando CIM da amostra < CIM<sub>50</sub>, sensibilidade intermediária (I) quando CIM<sub>50</sub> < CIM da amostra ≤ CIM<sub>90</sub> e resistente (R) quando CIM da amostra > CIM<sub>90</sub>, conforme realizado por Nascente *et al.* (2003), que utilizaram antifúngicos convencionais.

## RESULTADOS

Os resultados obtidos através do teste de microdiluição em caldo confirmam o efeito antifúngico do óleo essencial de orégano frente a isolados clínicos de *M. pachydermatis*. A análise cromatográfica do óleo essencial identificou 12 constituintes (Fig. 1), sendo timol (pico 13), α-terpineno (pico 5) e 4-terpineol (pico 11) os compostos majoritários.

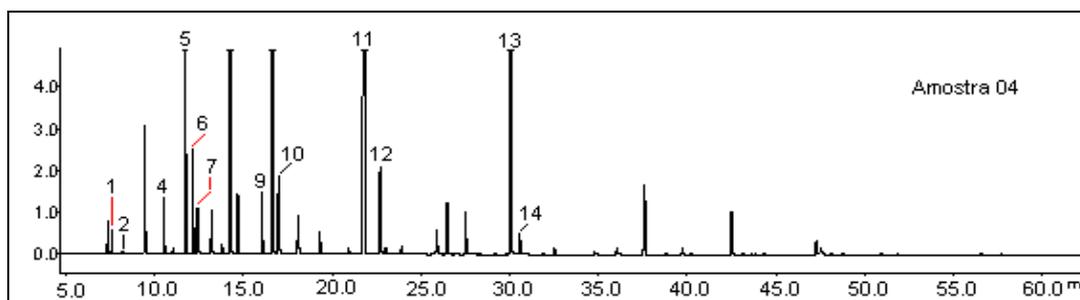


Figura 1 – Padrões utilizados e os picos dos constituintes encontrados na cromatografia gasosa da amostra de *Origanum vulgare*, sendo: 1- α-pineno; 2- canfeno; 3- β-pineno; 4- mirceno; 5- α-terpineno; 6- p-cimeno; 7- Limoneno; 8- 1,8-cineol; 9- terpinoleno; 10- linalol; 11- 4-terpineol; 12- α-terpineol; 13- timol; 14- carvacrol.

A CIM e a CFM dos 42 isolados de *M. pachydermatis* variaram de ≤0,87 a 7mg/mL, com valores de CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> de 1,18 e 3,28mg/mL, respectivamente. A CIM e CFM do óleo de orégano para os isolados de dermatite foram de 1,75mg/mL para três isolados, ≤0,87mg/mL para dois isolados, 3,5mg/mL para um isolado e apenas um isolado com diferença

de CIM e CFM, respectivamente ≤0,87 e 1,75mg/mL. Os resultados com os valores de CIM e CFM estão distribuídos na Figura 2.

Quanto à sensibilidade, os isolados foram classificados em sensíveis, intermediários e resistentes, de acordo com a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> (Tab. 1).

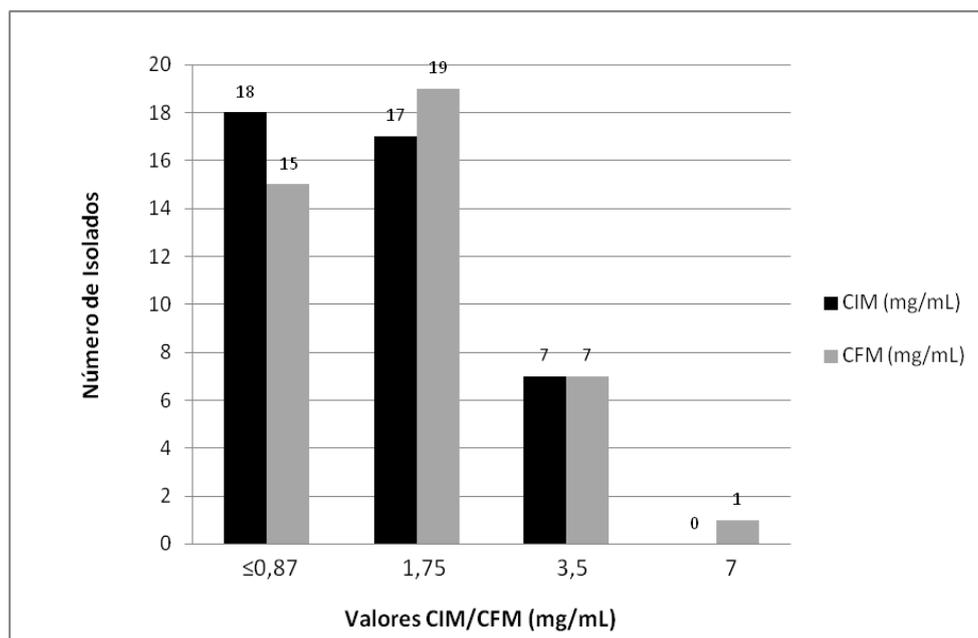


Figura 2. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de orégano frente a diferentes isolados clínicos de *M. pachydermatis* provenientes de otite e dermatite em cães.

Tabela 1. CIM do óleo essencial de orégano avaliando a sensibilidade de *M. pachydermatis* isoladas de cães com otite externa e dermatite através do método de microdiluição em caldo

	Microdiluição em caldo (mg/mL)		
	Concentração Inibitória Mínima		
	S	I	R
<i>Origanum vulgare</i>	n (%)	n (%)	n (%)
	<1,18	1,75	>3,28
	18 (42,86)	17 (40,48)	7 (16,66)

S: sensível; I: Intermediária; R: Resistente

## DISCUSSÃO

A busca por alternativas para a terapêutica da malasseziose justifica-se, uma vez que tem sido descrita a ocorrência de resistência antifúngica por parte dessa levedura, além do aumento de casos crônicos e recidivantes (Machado *et al.*, 2003; Santos *et al.*, 2008; Fera *et al.*, 2009), sendo reconhecida a importância clínica de *M. pachydermatis*, principalmente nos casos de otite externa em pequenos animais (Nobre *et al.*, 1998; Leite *et al.*, 2003; Nascente *et al.*, 2004). Além disso, *M. pachydermatis* tem se mostrado sensível a diferentes extratos vegetais e óleos essenciais de diversos produtos naturais, inclusive em concentrações baixas (Cardoso *et al.*, 2010; Lee e Lee, 2010; Lozina *et al.*, 2010), demonstrando a atividade promissora dos produtos naturais frente ao agente.

Os dados obtidos na análise cromatográfica do óleo estão de acordo com a literatura, sendo que os fenóis, como carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpeno e *p*-cimeno, podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo de *O. vulgare* (Simões *et al.*, 2003; Cleff, 2008). O timol foi um dos principais componentes isolados do óleo essencial estudado, concordando com os achados de Pistelli *et al.* (2012), cujo principal constituinte de *O. vulgare* foi o timol e com menores quantidades de *p*-cimeno. O timol e o carvacrol têm sido considerados como marcadores, pois são os componentes que identificam o *O. vulgare*, conforme foi encontrado por Cleff (2008), que avaliou a composição química de oito amostras do óleo essencial de orégano e identificou os compostos, como timol, carvacrol,  $\alpha$ -pineno e 4-terpineol, que variaram em suas concentrações.

Os constituintes 4-terpineol e  $\alpha$ -terpineno têm sido descritos como responsáveis pela ação antimicrobiana do orégano (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002; Chami *et al.*, 2004). Dessa forma, provavelmente essas altas concentrações contribuíram para os resultados de CIM e CFM para *M. pachydermatis*. Além disso, é possível que núcleos aromáticos, contendo um grupo polar, possam fazer ligações de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas, favorecendo essa atividade (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002).

Dentre os fármacos mais utilizados para as otites e dermatites, destacam-se os azóis, sendo o cetoconazol largamente utilizado na clínica de pequenos animais (Nobre *et al.*, 2002). Entretanto, fatores como o uso inadequado dos produtos comerciais que, muitas vezes, são utilizados indiscriminadamente, além da dose, frequência e tempo inadequado, podem estar relacionados com o surgimento de isolados resistentes (Machado *et al.*, 2003; Fera *et al.*, 2009; Nijima *et al.*, 2011).

A ampla variação dos resultados (CIM e CFM  $\leq 0,87$  a 7mg/mL) para o óleo de orégano frente aos isolados considerados resistentes em nosso estudo pode estar relacionada à diversidade dos casos clínicos, incluindo quadros agudos e crônicos. Neste caso, provavelmente resultando em relação inversa entre resistência e evolução do quadro clínico, já que os isolados provenientes de casos crônicos e recidivantes podem apresentar valores de CIM superiores.

A atividade antifúngica de *O. vulgare* tem sido descrita frente a diversos fungos, especialmente leveduras do gênero *Candida* (Manohar *et al.*, 2001; Chami *et al.*, 2004; Cleff *et al.*, 2010a; Cleff *et al.*, 2010b). Porém, estudos com espécies de *Malassezia* ainda são insipientes, principalmente utilizando isolados provenientes de animais. Em contrapartida, alguns autores vêm utilizando extratos vegetais em isolados de *M. pachydermatis*, incluindo extratos de *O. vulgare* (Prestes *et al.*, 2008; Cleff *et al.*, 2010a;

Galuppi *et al.*, 2010; Lee e Lee, 2010; Pistelli *et al.*, 2012). Esses estudos divergem em vários aspectos, como origem do óleo essencial e composição química, origem dos isolados e teste de sensibilidade utilizado.

O óleo essencial de orégano utilizado no presente estudo apresentou CIM e CFM  $\leq 0,87$  a 7mg/mL, valores considerados baixos para os isolados de *M. pachydermatis*, corroborando outros autores (Prestes *et al.*, 2008; Rusenova e Parvanov, 2009; Galuppi *et al.*, 2010) em relação à sensibilidade da levedura ao óleo essencial. E ainda, Cleff *et al.* (2010a) obtiveram valores entre 0,015 a 0,001% menores que os encontrados neste estudo. Já valores muito semelhantes foram observados por Prestes *et al.* (2008) e Rusenova e Parvanov (2009), que verificaram atividade antifúngica entre 0,06% e 0,25% do óleo essencial de orégano. Segundo Galuppi *et al.* (2010), o óleo essencial de orégano está entre os mais eficientes quando comparados aos 23 óleos testados em seu estudo frente a diferentes espécies de *Malassezia*. Para Pistelli *et al.* (2012), o óleo essencial de orégano apresentou CIM de 0,8%, valor este superior ao encontrado em nosso estudo.

## CONCLUSÃO

Com este estudo foi possível concluir que *M. pachydermatis* é sensível ao óleo essencial de orégano mesmo em concentrações baixas. Dessa maneira, o óleo essencial de orégano apresenta-se como promissor na bioprospecção de novos fármacos para o tratamento das otites e dermatites na clínica de pequenos animais.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (Processo 11/1225-0) pelo financiamento do projeto. À CAPES e ao CNPq pelas bolsas de estudo.

## REFERÊNCIAS

- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: ANVISA, 2011. 126p.
- CABAÑES, F.J.; VEJA, S.; CASTELL, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. *Med. Mycol.*, v.49, p.40-48, 2011.
- CAMPBELL, J.J.; COYNER, K.S.; RANKIN, S.C. *et al.* Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. *Vet. Dermatol.*, v.21, p.619-25, 2010.
- CANIZZO, F.T.; ERASO, E.; EZKURRA, P.A. *et al.* Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Med. Mycol.*, v.45, p.357-361, 2007.
- CARDOSO, R.L.; MABONI, F.; MACHADO, G. *et al.* Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet. Microbiol.*, v.142, p.432-434, 2010.
- CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S. *et al.* Antifungal Treatment With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.8, p.217-226, 2004.
- CLEFF, M.B. *Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de Origanum vulgare L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em Candida spp.* 2008. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; FARIA, R.O. *et al.* Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.1291-1294, 2010a.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; XAVIER, M. *et al.* *In vitro* susceptibility of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Braz. J. Microbiol. (Impresso)*, v.41, p.116-123, 2010b.
- CLSI M27A3. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*. Approved Standard-Third Edition, 2008.
- FERA, M.T.; CAMERA, E.L.C.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, *in vitro* activity and mechanisms of resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.*, v.7, p.981-998, 2009.
- GALUPPI, R.; AURELI, S.; BONOLI, C. *et al.* Effectiveness of essential oils against *Malassezia* spp.: comparison of two *in vitro* tests. *Mikol. Lek.*, v.17, p.79-84, 2010.
- JESUS, F.P.K.; LAUTERT, C.; ZANETTE, R.A. *et al.* *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. *Vet. Microbiol.*, v.152, p.161-164, 2011.
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, v.91, p.453-462, 2001.
- LEE, J.; LEE, J. Inhibitory effect of Plant Essential Oils on *Malassezia pachydermatis*. *J. Appl. Biol. Chem.*, v.53, p.184-188, 2010.
- LEITE, C.A.L.; ABREU, V.L.V.; COSTA, G.M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.55, p.102-104, 2003.
- LOZINA, L.A.; PEICHOTO, M.E.; BOEHRINGER, S.I. *et al.* Efficacy of Argentine propolis formulation for topical treatment of canine otitis externa. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.1359-1366, 2010.
- MACHADO, M.L.S.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L. *et al.* Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. *Clin. Vet.*, v.44, p.27-34, 2003.
- MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J. *et al.* Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol. Cel. Biochem.*, v.228, p.111-117, 2001.
- NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M. *et al.* Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.26, p.79-82, 2004.
- NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; SCHUCH, L.F. *et al.* Evaluation of *Malassezia pachydermatis* antifungal susceptibility using two different methods. *Braz. J. Microbiol. (Impresso)*, v.34, p.359-362, 2003.

*Atividade antifúngica...*

- NIJIMA, M.; KANO, R.; NAGATA, M. *et al.* An azoleresistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. *Vet. Microbiol.*, v.149, p.288-290, 2011.
- NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR, L.F. *et al.* *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. *Cienc. Rural*, v.28, p.447-452, 1998.
- NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Cienc. Rural*, v.32, p.175-184, 2002.
- PISTELLI, L.; MANCIANTI, F.; BERTOLI, A. *et al.* Antimycotic activity of some aromatic plants essential oils against canine isolates of *Malassezia pachydermatis*: an *in vitro* assay. *Open Mycol. J.*, v.6, p.17-21, 2012.
- PRESTES, L.S.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. *et al.* Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Rev. Cub. Plant. Med.*, v.13, p.4-8, 2008.
- RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trak. J. Sci.*, v.7, p.37-43, 2009.
- SANTOS, J.A.; MARTINS, L.A. Atividade *in vitro* de antifúngicos frente a isolados de *Malassezia* spp. de animais atendidos no hospital veterinário da Unipar. *Arq. Cienc. Vet. Zool.*, v.11, p.175-178, 2008.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. *et al.* (Ed) *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. 1102p.
- SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O. *et al.* Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. *Rev. Hig. Alim.*, v.19, p.40-45, 2005.
- ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. *J. Food Microbiol.*, v.64, p.373-378, 2001.
- VEIGA Jr., V.F.; PINTO, A.; MACIEL, M.A.M. Plantas Mediciniais: Cura segura?. *Química Nova (Impresso)*, v.28, p.519-528, 2005.