

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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*ORIGANUM VULGARE* L. FRENTE A FUNGOS DE IMPORTÂNCIA EM  
VETERINÁRIA COM ÊNFASE EM *CANDIDA* SPP.**

**MARLETE BRUM CLEFF**

**PORTO ALEGRE**

**2008**

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

**Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp.**

Autor: Marlete Brum Cleff.

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, junto a Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul na área de Medicina Veterinária Preventiva, especialidade Farmacologia e Terapêutica Animal.

Orientador: João Roberto Braga de Mello

**PORTO ALEGRE**

**2008.**

**MARLETE BRUM CLEFF**

**Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp.**

Aprovada em .....de .....2008.

APROVADA POR:

---

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

---

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles  
Membro da Comissão

---

Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues  
Membro da Comissão

---

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

A minha família, em especial, aos meus pais, pessoas de grande sabedoria.

A todos os animais, que fazem, fizeram ou farão parte de minha trajetória, o meu respeito e eterna gratidão.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por nos permitir participar desta experiência a qual chamamos de vida,... e a minha família.... em especial aos meus amores..... Nedy, Victor, Lucas e Thomas.

Ao meu orientador, Prof. João Roberto de Braga Mello, pela confiança e pela oportunidade, fundamentais para a realização deste trabalho;

Ao Prof. Mário e a Prof<sup>a</sup>. Regina, pela confiança e incentivo, pelas oportunidades e orientações tantas vezes solicitadas, além de todo apoio e amizade;

Ao Prof. Schuch pela orientação, paciência e amizade, além da realização da análise estatística deste trabalho;

A “velha guarda”, amigas de verdade..... Ana Raquel Mano Meinerz (Meinerz); Patrícia da Silva Nascente (Na), Renata Osório Faria (Rê), Tatiana de Ávila Antunes (Antunes), Lorena Leonardo Souza (Lóren), Helen Silveira Coimbra e Márcia Nobre, que sempre estiveram presente de uma forma ou de outra, obrigado por existirem e fazerem parte da minha jornada;

Às “amigas de fé”e que já fazem parte da velha guarda: (Anesinha) Anelise Afonso Martins, (Mel) Melissa Xavier, (Kit) Isabel Madrid, Sema (Rosema Santin), Antonella Mattei, Aninha (Ana Paula Albano), cada uma de vocês sabe o quanto foram imprescindíveis..... Obrigado!

Aos estagiários e bolsistas, o meu reconhecimento pela inestimável ajuda no desenvolvimento do trabalho, em especial a (Anezona) Anelise Oliveira Fonseca, (Lu) Luiza Osório, (Angelina) Ângela Cabanã, (Frank) Franklin Vaz da Silva, Ju (Juliana Lelling), Iara, ... Obrigado pela amizade e comprometimento;

Às Médicas Veterinárias, aos funcionários, professores do Laboratório de Doenças Infeciosas e da Faculdade de Veterinária da UFPel que de alguma forma, direta ou indiretamente, colaboraram com este trabalho... Silvia Ladeira, Renata Schramm, João Zani, Paulo Rosler,

Ao CNPq pela Bolsa de Estudo e Taxa de Bancada e pelos recursos disponibilizados através do financiamento do projeto que fez parte deste trabalho. Ao Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS.

## RESUMO

**Cleff, Marlete Brum. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp.**

**Orientador: João Roberto Braga de Mello**

O estudo teve como objetivos avaliar a ação antifúngica *in vitro* e *in vivo* do óleo essencial do *Origanum vulgare* (orégano), determinar a composição química dos óleos estudados e verificar a toxicidade em ratos Wistar. Inicialmente, oito amostras de *O. vulgare* foram extraídas por hidrodestilação e os óleos essenciais analisados por cromatografia gasosa, sendo posteriormente testados *in vitro* para escolha do óleo para os ensaios *in vivo*. Os testes *in vitro* seguiram as normas estabelecidas pelo CLSI-M27-A2, sendo utilizados sete isolados de *Sporothrix schenckii* e 16 isolados de *Candida* spp. A toxicidade do *O. vulgare* foi avaliada em 30 ratos wistar, fêmeas, tratadas via oral e vaginal com óleo a 3%, por 30 dias, através de parâmetros clínicos, hematológicos e histopatológicos. Para o teste *in vivo*, foram utilizados 48 ratos wistar, machos, distribuídos em quatro grupos: T1:óleo (1,5%); T2:óleo (3%); T3:fluconazol (10mg/Kg/dia); T4:controle negativo (emulsão); os óleos foram emulsionados com 0,001% de Tween 80. Para a reprodução experimental da candidíase sistêmica foi utilizado isolado canino e o inóculo ( $10^6$  céls/mL de *C. albicans*) foi administrado pela veia lateral da cauda em todos os animais. Os fármacos e o diluente foram administrados diariamente por via oral, com auxílio de sonda oro-gástrica, durante 30 dias. Foi realizada avaliação clínica semanal e pesagem dos animais, e após a necropsia foi realizada análise macroscópica, pesagem dos órgãos e retroisolamento de *C. albicans*. O óleo essencial do *O. vulgare* utilizado nos testes *in vitro* apresentou como componentes majoritários o 4-terpineol, carvacrol, timol e  $\alpha$ -terpineol. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do *O. vulgare* para *S. Schenckii* foi de 0,25% ( $250\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ ) para todos os isolados testados. Para *Candida* spp. os resultados foram expressos em CIM e CFM (Concentração Fungicida Mínima), obtendo-se CIM de  $2,72\mu\text{L mL}^{-1}$  e CFM de  $5\mu\text{L mL}^{-1}$  para *C.albicans* isolada de animais; CIM de  $2,97\mu\text{L mL}^{-1}$  e CFM  $3,54\mu\text{L mL}^{-1}$  para cepas padrões e CIM igual  $2,10\mu\text{L mL}^{-1}$  e CFM igual  $2,97\mu\text{L mL}^{-1}$  para espécies não-albicans. A utilização do óleo essencial de *O. vulgare* a 3%, uma vez ao dia, 30 dias, por via oral e vaginal, não causou toxicidade nos ratos wistar. Na candidíase experimental sistêmica, os animais tratados com óleo a 3% e com fluconazol resultaram em menor frequência de alterações clínicas. Não houve diferenças entre os grupos quanto a alterações macroscópicas nos órgãos, com exceção dos rins, onde o grupo T3 diferiu dos demais grupos (T1,T2,T4) sendo aquele com menor alterações. Quanto ao retroisolamento, foi obtido menor quantidade de Unidades Formadoras de Colônias no grupo T3 e maior no T4. Dessa forma é possível concluir que o óleo essencial do *O. vulgare* possui atividade *in vitro* frente ao *S. schenckii* e *Candida* spp. e que sua composição química interfere nos resultados. A utilização do óleo à 3%, via oral e vaginal por 30 dias não causou alterações toxicológicas relevantes em ratas Wistar. O uso do óleo a 3% demonstrou bons resultados no tratamento da candidíase experimental sistêmica, porém são necessários maiores estudos que possibilitem introduzir esta substância como opção terapêutica para candidíase.

**Palavras-chave:** *O. vulgare*, *Candida*, *S. schenckii*, *in vitro*, *in vivo*.

**ABSTRACT**

**Cleff, Marlete Brum.** Evaluation of the antifungal activity of *Origanum vulgare* L. against important fungi in veterinary medicine with emphasis in *Candida* spp.

**Adviser: João Roberto Braga de Mello**

The aims of this study were to evaluate the *in vitro* antifungal activity of the essential oil *Origanum vulgare* (oregano), to determine the chemical composition of the oils tested and to verify their toxicity to rats. Eight samples of *Origanum* were extracted by hydrodistillation, and the composition of the essential oils was determined by gaseous chromatography. *In vitro* antifungal sensitivity was performed with CLSI-M27-A2 protocol. Seven isolates of *Sporothrix schenckii* and 16 isolates of *Candida* species were tested. The animal model consisted of female wistar rats, which were treated orally and vaginally with 3% oil for 30 days. Animals were analyzed by clinical, hematological and histopathologic parameters. For the *in vivo* test, 48 rats wistar were used, distributed in four groups: T1/n=12: oil 1,5%; T2/n=12:oil 3%; T3/n=12: Fluconazole 10mg/Kg; T4/n=12: Control (emulsion); the oils had been emulsified with 0,001% of Tween 80. The experimental disease was carried with one canine isolate, which was prepared with a suspension of *C. albicans* ( $10^6$  céls/mL), and inoculated for the lateral vein of the tail. The drugs and diluent had been administered daily orally during 30 days. Weekly clinical evaluation and weighing of the animals were performed, and at the end of experiment autopsies were done with macroscopic analysis, weighing of the tissues and retro isolation of *C. albicans*. The *O. vulgare* essential oil used in the tests *in vitro* showed 4-terpineol, carvacrol, timol and alfa-terpineol as majority component. The Minimum Inhibitory Concentration (CIM) of the *O. vulgare* for *S. schenckii* was 0,25% (250 $\mu$ L/mL), for all the isolates tested. For *Candida* spp. the results had been express in CIM and CFM (Concentration Fungicidal Minimum), showing CIM 2,72 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> and CFM 5 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> for *C.albicans* isolates from animals; CIM 2,97 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> and CFM 3,54 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> for standards strains and CIM 2,10  $\mu$ L mL<sup>-1</sup> and CFM 2,97 $\mu$ L<sup>-1</sup>mL for species non-albicans. The use of the 3% essential oil, daily for 30 days, orally and vaginally, did not cause toxicity in the rats. In systemic experimental candidiasis, animals treated with 3% oil and fluconazole showed lesser frequency of clinical alterations. Differences between the groups weren't observed in the organs macroscopic alterations, with exception of the kidneys that presented more lesions in the group T3. The retro isolation was higher in the T4 group and in the group T3 was of minor. Thus, we conclude that the *O. vulgare* essential oil have activity *in vitro* against *S. schenckii* and *Candida* spp. and its chemical composition intervenes in the results. The use of the 3% oil for 30 days does not cause oral and vaginal significative alterations in wistar rats. The use of the 3% oil demonstrated good results in the treatment of systemic experimental candidiasis, however other studies are necessary to introduce this substance as a therapeutic option for candidiasis.

Key-Words: *O. vulgare*,Essential oil, *Candida*, *S. schenckii*, *in vitro*, *in vivo*

## LISTA DE FIGURAS

### ARTIGO I

**FIGURA 1** – Lesões cutâneas em região inguinal, membros e face de cão Dachshund, após 10 dias de uso do antifúngico..... 32

**FIGURA 2** – Lesões cutâneas em cão Dachshund, após 20 dias de uso do antifúngico..... 32

### ARTIGO II

**FIGURA 1** – Cromatograma correspondente a amostra do óleo essencial de orégano, preparado em solução de 5000 mg L<sup>-1</sup> em hexano. Picos dos padrões: 1.  $\alpha$ -pineno; 2. canfeno; 3.  $\beta$ -pineno; 4. mirceno; 5.  $\alpha$ -terpinemo; 6. *p*-cimeno; 7. limoneno; 8. 1,8-cineol; 9.  $\gamma$ -terpineno; 10. terpinoleno; 11. linalol; 12. 4-terpineol; 13.  $\alpha$ -terpineol; 14. timol; 15. carvacrol..... 41

### ARTIGO III

**FIGURA 1** – Gráfico representativo da concentração (%) dos compostos *p*-cimeno, 4-terpineol, timol e carvacrol, nas diferentes amostras de óleo essencial do *O. vulgare* (orégano), analisados por cromatografia a gás (GC/FID). Amostras: 1- Erechim; 2- Aves; 3- El Moncayo; 4- La Rosa; 5- Del Gaúcho; 6- Goes; 7- Treichel; 8- Terranueva..... 56

### ARTIGO IV

**FIGURA 1** - Results of minimum inhibitory concentration (CIM) and minimum fungicidal concentration (CFM) for *Origanum vulgare* essential oil on the growth of isolated of *C. albicans* from mucous of the animals, standards *Candida* spp and isolates no-albicans..... 69

**FIGURA 2** - Chromatogram of oregano essential oil obtained by hydrodistillation in Clevenger, essential oil where one can see that terpineneol (peak 20),  $\alpha$ -terpineol (peak 21) and are the major components, followed by thymol (peak 26) and carvacrol (peak 27). Peaks identification in table 2..... 69

### ARTIGO VI

**FIGURA 1** - Análise por escore dos parâmetros clínicos avaliados nos quatro grupos de tratamento, observando diferença estatisticamente significativa no Grupo T4, quando comparado aos outros grupos (T1, T2, T3) ( $p < 0,05$ )..... 91

**FIGURA 2** - Média dos pesos dos animais experimentais pertencentes aos diferentes grupos de tratamento (T1,T2,T3,T4), nas quatro semanas do experimento..... 92



## LISTA DE TABELAS

### ARTIGO III

**TABELA 1** – Concentração (%) dos compostos presentes nos oito óleos essenciais do *O. vulgare* analisados por cromatografia gasosa (GC/FID)..... 54

**TABELA 2** - Valores referentes à Concentração Inibitória Mínima (CIM), de oito óleos essenciais do *O. vulgare* frente à *Candida* spp..... 55

### ARTIGO IV

**TABELA 1** - Results of Minimum Inhibitory Concentration (CIM) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM) for *Origanum vulgare* essential oil on the growth of *Candida* spp..... 68

**TABELA 2** - Principals compounds identified in *Origanum vulgare* essential oil, using chromatography analysis in a gas chromatograph with a flame ionization detector (GC/FID, model Shimadzu 17A)..... 70

### ARTIGO V

**TABELA 1** - Principais compostos e respectivas concentrações de terpenos encontrados no óleo essencial do *O. vulgare* analisado por cromatografia gasosa..... 81

**TABELA 2** – Média da massa corporal dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, vaginal e respectivos controles, aferidas semanalmente pelo período de cinco semanas..... 82

**TABELA 3** - Média da massa dos órgãos dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, vaginal e respectivos controles, aferidas ao final do experimento..... 82

**TABELA 4** - Valores médios referentes ao hemograma dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, vaginal e respectivos controles, aferidos ao final do experimento..... 83

### ARTIGO VI

**TABELA 1**- Alterações clínicas observadas nos animais experimentais com candidíase sistêmica durante o período de 30 dias do estudo..... 91

**TABELA 2**- Média de pesos dos órgãos em relação com a média de peso dos animais experimentais, e massa relativa dos órgãos, nos diferentes tratamentos ao final do período experimental..... 93

**TABELA 3**- Alterações macroscópicas observadas nos órgãos internos dos animais

experimentais com candidíase sistêmica durante o período de quatro semanas.....	93
<b>TABELA 4-</b> Retroisolamento de <i>C. albicans</i> de órgãos vitais, sangue e urina dos animais experimentais após cultura em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C.....	94

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	Vi
<b>ABSTRACT</b> .....	Vii
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	Ix
<b>SUMÁRIO</b> .....	Xi
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	3
2.1- Plantas medicinais.....	3
2.2- <i>Origanum vulgare</i> linneus (orégano).....	6
2.3-Antifúngicos tradicionais utilizados em veterinária.....	11
2.4- Fungos oportunistas em medicina veterinária.....	15
2.4.1- <i>Candida</i> spp.....	15
2.4.2- <i>Sporothrix schenckii</i> .....	22
<b>ARTIGO I - INFECÇÃO CUTÂNEA EM CÃO POR <i>CANDIDA ALBICANS</i></b> .....	26
RESUMO.....	27
ABSTRACT.....	27
RESUMEN.....	28
INTRODUÇÃO.....	28
RELATO DO CASO.....	29
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33
<b>ARTIGO II - ATIVIDADE IN VITRO DO ÓLEO ESSENCIAL DO</b>	

<i>ORIGANUM VULGARE</i> FRENTE À <i>SPOROTHRIX SCHENCKII</i> .....	34
RESUMO.....	35
SUMMARY.....	35
INTRODUÇÃO.....	36
MATERIAL E MÉTODOS.....	37
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
CONCLUSÕES.....	39
REFERÊNCIAS.....	39
<b>ARTIGO III</b> - ÓLEO ESSENCIAL DO <i>ORIGANUM VULGARE</i> FRENTE À <i>CANDIDA</i> SPP: AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE OITO AMOSTRAS COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE TIMOL/CARVACROL.....	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Amostras de <i>O. vulgare</i> .....	46
2.2 Obtenção do Óleo essencial.....	46
2.3 Análise Cromatográfica.....	46
2.4 Atividade antimicrobiana.....	46
2.4.1 Isolados de <i>Candida</i> spp.....	46
2.4.2 Preparação dos inóculos.....	47
2.4.3 Teste de suscetibilidade de <i>Candida</i> spp. frente ao óleo essencial.....	47
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
<b>ARTIGO IV</b> - <i>IN VITRO</i> SUSCEPTIBILITY OF <i>ORIGANUM VULGARE</i> ESSENTIAL OIL AGAINST <i>CANDIDA</i> SPECIES.....	57

ABSTRACT.....	58
RESUMO.....	59
INTRODUCTION.....	59
MATERIAL AND METHODS.....	60
Plant material.....	60
Essential oil .....	61
Chemicals.....	61
Chromatography analysis.....	61
ANTIMICROBIAL ACTIVITY.....	62
Isolates of <i>Candida</i> species.....	62
Preparation of the inoculum.....	62
Antifungal susceptibility testing.....	62
Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast.....	62
STATISTICAL ANALYSIS.....	63
RESULTS AND DISCUSSION.....	63
CONCLUSIONS.....	64
ACKNOWLEDGMENTS.....	65
BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES.....	65
<b>ARTIGO V - Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do</b> <i>Origanum Vulgare</i> L. (Orégano) em Ratas Wistar.....	71
RESUMO.....	72
SUMMARY.....	72
INTRODUÇÃO.....	73
MATERIAL E MÉTODOS.....	74
Animais experimentais.....	74

Grupos experimentais.....	74
Dose de Ensaio, Preparo e Administração.....	74
Obtenção do Óleo essencial <i>de O. Vulgare</i> .....	75
Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama (GC/FID).....	75
Acompanhamento Clínico.....	75
Avaliação Hematológica.....	76
Análise histopatológica.....	76
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
Agradecimentos.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79
<b>ARTIGO VI - AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO O. VULGARE NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE EXPERIMENTAL SISTÊMICA.....</b>	<b>84</b>
RESUMO.....	85
ABSTRACT.....	86
INTRODUÇÃO.....	86
MATERIAL E MÉTODOS.....	87
Obtenção do óleo essencial do <i>O. vulgare</i> .....	87
Animais experimentais.....	88
Grupos experimentais.....	88
Isolados de <i>Candida albicans</i> utilizado no estudo .....	88
Preparo do inóculo fúngico.....	88
Inoculação experimental.....	89
Candidíase Experimental Sistêmica.....	89
Tratamento dos animais experimentais .....	89

Acompanhamento clínico dos animais experimentais com candidíase sistêmica....	89
Necropsia dos animais experimentais.....	89
Retroisolamento de <i>Candida albicans</i> .....	90
ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	90
RESULTADOS.....	90
Avaliação clínica dos animais experimentais com candidíase sistêmica.....	90
Avaliação do peso dos animais experimentais com candidíase experimental sistêmica.....	92
Alterações macroscópicas nos animais experimentais.....	93
Obtenção do retroisolamento de <i>C. albicans</i> .....	94
DISCUSSÃO.....	94
CONCLUSÃO.....	98
AGRADECIMENTOS.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	98
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>102</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>103</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A utilização das plantas como medicamento provavelmente seja tão antiga quanto o próprio homem. Há evidências de que o homem pré-histórico já fazia uso de inúmeras espécies vegetais para amenizar as doenças (Castro & Chemale, 1995; Pinto et al., 2002). As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Esses produtos apresentam uma gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (Yunes & Calixto, 2001; Pinto et al., 2002). Apesar do grande número de pesquisas nesta área, os dados disponíveis revelam que apenas 15 a 17% das plantas foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal (Soejarto, 1996; Simões et al., 2003).

O Brasil é o país com a maior diversidade vegetal do mundo, contando com mais de 55.000 espécies catalogadas, sendo que o uso de plantas no tratamento das doenças apresentou, fundamentalmente, influências da cultura indígena, africana e européia e, essas influências, constituem a base da medicina popular que nos proporciona valiosas informações quanto às propriedades e indicações das plantas medicinais brasileiras (Yunes & Calixto, 2001; Pinto et al., 2002; Simões et al., 2003).

Os condimentos da família das Labiadas, que contém os compostos fenólicos, carvacrol e/ou timol, como o *Origanum vulgare* L., têm sido largamente utilizados como tempero na culinária brasileira. Além do extensivo uso na culinária, o orégano também é conhecido pelo seu valor medicinal, sendo aceito oficialmente em inúmeros países (Baratta et al., 1998, Dorman et al., 2000, Vichi et al., 2001). O óleo essencial de orégano é rico em compostos fenólicos como, carvacrol, timol, alfa-terpineol e gama-terpineol os quais normalmente se apresentam como compostos majoritários do óleo essencial, sendo responsáveis por sua propriedade antibacteriana, antifúngica e antioxidante (Houmani, 2002; Vincenzi et al., 2004; Kabouche et al., 2005).

As infecções micóticas vêm crescendo em incidência e fatalidade nos últimos anos, principalmente as causadas pelos fungos do gênero *Candida*, devido em parte, a sobrevida de pacientes transplantados e neutropênicos, ao uso indiscriminado de drogas



imunossupressoras e as doenças imunodepressoras (Rippon, 1988; Know-chung & Bennett, 1992; Sidrim & Moreira, 1999; Lacaz et al., 2003). A maior frequência de candidíase tem sido observada nos animais de companhia, e assim como em humanos a micose tende a ser mais ocorrente nos animais com o sistema imune comprometido (Ferreiro et al., 2002; Rodriguez et al., 2003; Moretti et al., 2006; Cleff et al., 2007). A esporotricose, micose subcutânea causada pelo *Sporothrix schenckii*, juntamente com candidíase, representa uma micose emergente em Medicina Veterinária, principalmente em felinos domésticos, espécie frequentemente envolvida nos relatos zoonóticos da enfermidade (Brustein et al., 2000; Castro et al., 2001; Schubach et al., 2003). Nesse contexto, tanto a candidíase como a esporotricose podem ser consideradas enfermidades de importância para a Saúde Pública.

Em geral, o tratamento das micoses em veterinária é realizado com os agentes poliênicos, alilaminas ou azóis, entretanto estes fármacos apresentam problemas relacionados ao espectro de atividade, toxicidade e resistência, aumentando assim a necessidade de pesquisas de novas substâncias com atividade antifúngica (Nobre et al., 2002; Farias & Giuffrida, 2002; Bergold & Goergiadis, 2004; Catalán & Montejo, 2006).

A pesquisa com plantas tem despertado interesse, em função da grande diversidade molecular dos produtos naturais, que é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, e possível ação antimicrobiana (Nisbet & Moore, 1997; Pinto et al., 2002).

Estudos prévios avaliando o óleo essencial de *Origanum vulgare* quanto à atividade antifúngica (Manohar et al., 2001; Chami et al., 2004) demonstram boa ação em testes *in vitro*, sendo que os resultados obtidos até o momento indicam a necessidade de um estudo multidisciplinar, com envolvimento de diferentes áreas do conhecimento científico, como farmacologia, química e microbiologia. Diante do exposto, os objetivos deste trabalho foram: 1. Determinar a composição química do óleo essencial do *O. vulgare*; 2. Avaliar *in vitro* a atividade antifúngica do óleo essencial do *O. vulgare* frente à *Candida* spp. e *Sporothrix schenckii*; 3. Avaliar a toxicidade oral e vaginal do uso de doses repetidas do *O. vulgare* em ratos wistar; 4. Estudar a eficácia do óleo essencial do *O. vulgare* no tratamento da candidíase sistêmica em modelo experimental.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 – PLANTAS MEDICINAIS

O conhecimento sobre as plantas tem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. Por meio de análises de pólen e outros materiais, pode-se afirmar que os homens pré-históricos já utilizavam plantas medicinais (Castro & Chemale, 1995). Os primeiros registros do uso das plantas na medicina, que se tem conhecimento estão nos papiros egípcios, e nos escritos chineses em folhas de bambu. No ano 3000 a.C, no antigo Egito, os papiros registraram o uso de quinhentas plantas medicinais, entre elas a Menta, Alecrim, Ginseng, Camomila, Absinto, Babosa, Terebentina, e Tomilho, sendo a maioria delas ainda utilizadas (Yunes & Calixto, 2001; Simões et al.; 2003). Hipócrates (460-377 a.C.) reuniu em sua obra "Corpus Hipocratium" a indicação de inúmeros remédios vegetais para cada uma das enfermidades conhecidas de seu tempo e, no começo da Era Cristã, Dioscórides, enumerou em seu "Tratado de Matéria Médica", mais de 500 drogas de origem vegetal, descrevendo o emprego terapêutico para muitas delas (Pinto et al., 2002). Posteriormente, durante o período das grandes navegações surgiu a possibilidade da descoberta de novas plantas, que foram levadas de um continente a outro, deixando um valioso arsenal terapêutico para o mundo moderno (Castro & Chemale, 1995; Pinto et al., 2002).

Os primeiros registros da utilização de extratos de plantas são do ano de 1500 d.C, quando foi criada a primeira escola de medicina fundada por Carlos Magno em Salerno, Roma. Neste período destilados como o vinho, vodka e o gim, eram utilizados para retirar a essência das plantas. Métodos de extração mais eficientes foram adotados por volta dos anos 1500, quando o éter etílico foi usado por Paracelsus na Alemanha para extração. O "extrato etéreo" das plantas concentrava os princípios ativos e tornava mais poderosa a preparação das drogas (Castro & Chemale, 1995; Simões et al., 2003).

Estudos demonstram que muitas espécies estão desaparecendo do planeta sem terem sido minimamente estudadas, sendo citado que apenas 15-17% das reservas vegetais foram estudadas quanto a algum aspecto, devido, principalmente ao desmatamento e ocupação desordenada do ambiente (Soejarto, 1996; Yunes & Calixto, 2001; Guerra & Nodari, 2003).

Com a redução progressiva de grande parte desta biodiversidade, ocorre também uma enorme perda científica, econômica e cultural, especialmente para os países menos desenvolvidos, que são os detentores da maior parte das reservas vegetais do mundo (Guerra & Nodari, 2003).

Porém, nas últimas décadas, houve um ressurgimento do interesse nas plantas como fontes de novos agentes terapêuticos (Yunes & Calixto, 2001; Guerra & Nodari, 2003). Grandes companhias investiram na pesquisa com extratos vegetais, a fim de descobrir novas substâncias ativas (Cragg et al., 1997; Yunes & Calixto, 2001; Guerra & Nodari, 2003). Aliado a todo o interesse, os estudos da atividade terapêutica de plantas medicinais, tiveram um grande impulso, quando a química orgânica possibilitou modificar a estrutura dos produtos naturais, tendo em vista um aumento na atividade ou seletividade e a redução dos efeitos colaterais ou toxicidade (Cordell et al., 2001).

Os produtos naturais possuem diversas aplicações para o homem, como na preparação de medicamentos e cosméticos, na área industrial, na produção de alimentos, perfumes, pigmentos, resinas, ceras, gorduras, borrachas, entre outros. Dessa maneira tornou-se necessário a utilização de métodos de separação e identificação das substâncias presentes nas plantas (Simões et al., 2003; Yunes & Calixto, 2001). Assim, o desenvolvimento do estudo químico de plantas, ou fitoquímica, está diretamente relacionado à utilização e ao desenvolvimento de técnicas rápidas e precisas, que permitam o isolamento de compostos de interesse (Simões et al., 2003).

As plantas medicinais produzem diferentes substâncias químicas, como alcalóides, esteróides e terpenos, à partir de nutrientes, da água e luz que recebem, e o fazem em diferentes proporções, dependendo de fatores ambientais, climáticos, geográficos além de fatores ligados à própria planta (Yunes & Calixto, 2001; Simões et al., 2003). Os processos vitais de biossíntese são responsáveis pela formação, acúmulo e degradação dessas substâncias no interior das células que formam os diversos tecidos dos organismos vegetais e animais (Matos et al., 1997). Os constituintes químicos são sintetizados e degradados por inúmeras reações anabólicas e catabólicas, que compõem o metabolismo das plantas (Castro & Chemale, 1995; Di Stasi et al., 1996; Simões et al., 2003).

Os compostos resultantes desse metabolismo podem ser considerados como produtos do metabolismo primário (glicídios, protídios e lipídios) e produtos do metabolismo secundário (terpenóides, alcalóides, glicosídios, flavanóides, fenilpropanóides, etc) (Matos et al., 1997). Os metabólitos secundários são caracterizados por não serem vitais para as plantas na maioria das vezes, por apresentar diferenças qualitativas e quantitativas entre as diferentes espécies, e ainda, por serem produzidos em pequenas quantidades (Simões et al., 2003; Amzallag et al., 2005; Gobbo Neto & Lopes, 2006).

A classificação dos compostos em primários e secundários depende muito da importância de determinado composto para uma determinada espécie, assim como do estágio de desenvolvimento em que se encontra a planta (Castro & Chemale, 1995). De forma simplificada, os componentes químicos dos óleos voláteis e das especiarias podem ser divididos com base na biossíntese que lhes deu origem em duas grandes classes, sendo elas derivados de terpenóides, formados através do ácido mevalônico e nos compostos fenilpropanóides, formados através do ácido chiquímico (Allinger, 1976; Gobbo-Neto & Lopes, 2006).

Os produtos do metabolismo secundário são responsáveis pelas propriedades terapêuticas das substâncias extraídas de plantas e animais. Os fármacos podem ser utilizados com tais, na forma natural ou na forma de extratos, cujos princípios são empregados como agentes terapêuticos, como no caso dos terpenos (Cragg et al., 1997; Yunes & Calixto, 2001; Amzallag et al., 2005).

O precursor dos terpenos é o ácido mevalônico, que é produzido a partir da condensação aldólica de uma unidade da acetoacetil-CoA com uma molécula de acetil-CoA. Após a condensação ocorre uma hidrólise originando 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA que é reduzida a mevalonato. O mevalonato é então convertido em isopentenil-pirofosfato ou isopreno ativo, que é a unidade de formação dos terpenos (Santos, 2002).

Os terpenos estão presentes principalmente nos óleos essenciais, que se formam num grande número de plantas aromáticas, como subprodutos do metabolismo secundário (Castro & Chemale, 1995; Barata et al., 1998; Baydar et al., 2004). Plantas aromáticas são assim denominadas devido ao fato de armazenarem óleos essenciais em células secretoras individuais, ou formando estruturas como dutos ou canais, tricomas glandulares e outras (Simões et al., 2003). A extração destes óleos pode ser realizada com plantas frescas ou

secas, mediante destilação com vapor de água, extração pura e simples, ou outras técnicas como pelo uso de pressão. Do ponto de vista químico, os óleos essenciais apresentam-se como misturas extremamente complexa (Allinger, 1976; Rodrigues, 2002).

Neste contexto o óleo essencial do orégano tem despertado grande interesse, pois, além de ser conhecido por suas ações tônicas, apresenta uma riqueza em compostos fenólicos, os quais têm sido citados como responsáveis por sua intensa atividade antimicrobiana (Baratta et al., 1998, Dorman et al., 2000; Aligiannis et al., 2001; Vichi et al., 2001; Baydar et al., 2004; Souza et al., 2005).

## **2.2- *ORIGANUM VULGARE* Linneus (Orégano)**

O orégano originou-se na região do Mediterrâneo, e segunda uma lenda grega, foi Afrodite (Deusa do amor) a primeira pessoa a cultivar o orégano, e assim lhe conferiu um perfume para que pudesse ser facilmente reconhecido. Hoje se sabe que o aroma próprio do orégano, é característico de espécies de plantas que produzem óleo essencial com um conteúdo relativamente alto de fenóis, mais especificamente, carvacrol ou timol (Castro & Chemale, 1995; Simões et al., 2003).

*Origanum vulgare* L. é uma planta perene que se adapta bem em solos secos e calcários. A grande maioria das espécies *Origanum* é nativa das regiões do Mediterrâneo (Grécia, Irã, Turquia), porém também são cultivadas na Europa, ao leste e centro da Ásia e Taiwan (Castro & Chemale, 1995; Kokkini et al., 1994; Arcila-Lozano et al., 2004). Nas Américas foi introduzido pelo homem para ser utilizado principalmente como tempero. O principal produtor de orégano na América do Sul é o Chile, seguido pela Bolívia e Peru, sendo cultivado em menor escala na Argentina e Uruguai (Castro & Chemale, 1995; Tsinas, 1999; Arcila-Lozano et al., 2004).

O gênero *Origanum* pertence à família Lamiaceae, que é composta por 3 grupos, 10 secções, 38 espécies, 6 subespécies e 17 híbridos, sendo caracterizada por uma larga diversidade morfológica e química. As diferentes espécies são largamente empregadas e têm diferentes nomenclaturas, sendo os mais conhecidos o orégano grego (*Origanum vulgare hirtum* L.), orégano turco (*Origanum onites* L.), orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* L.) e o orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) (Kokkini et al., 1994; Arcila-Lozano et al., 2004).

Na medicina popular, o orégano tem sido usado como chá, citado ao longo dos anos, inclusive na mitologia grega, sendo atribuídas algumas propriedades, tais como potente na cicatrização de feridas e úlceras gástricas, indução de partos, antihemorrágico, estimulante do sistema nervoso e digestivo, antioxidante (Yunes & Calixto, 2001). É um dos condimentos mais populares do mundo, sendo utilizado na culinária de diferentes países sendo as folhas e flores, tanto secas como verdes as partes preferencialmente utilizadas, além de aplicação com fins terapêuticos (Rodrigues, 2002; Souza et al., 2005). O uso com finalidades terapêuticas vem sendo difundido através de experiências positivas de ação na tradicional medicina indiana, sendo intensamente utilizado na homeopatia. Em escala industrial o óleo essencial tem sido utilizado no preparo de cosméticos, vinagres e na dentística, entretanto a importância do estudo dessas plantas está principalmente relacionada às suas propriedades antimicrobianas (Baratta et al., 1998; Dorman et al., 2000; Aligiannis et al., 2001; Vichi et al., 2001; Baydar et al., 2004; Souza et al., 2005).

A composição química dos óleos essenciais é muito variável, assim como o percentual de óleo presente nos vegetais, sendo esta influenciada principalmente pelo clima, estação do ano, variedade e espécie, região, solo, estágio de crescimento da planta, época da colheita, além do método de extração (Kokkini et al., 1994; Simões et al., 2003; Amzalladg et al., 2005; Vagi et al., 2005).

A quantidade de carvacrol ou timol presentes nos óleos essenciais é responsável pela sua classificação como óleo de orégano, sendo citado que a variação na composição química dos óleos essenciais do orégano provavelmente tem uma ligação com suas propriedades antimicrobianas (Vincenzi et al., 2004). Tem sido descrito que o óleo essencial de *Origanum vulgare* apresenta em torno de 34 compostos ativos, sendo que os fenóis como carvacrol, timol, gama terpeno e p-cimeno podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo (Rodrigues, 2002; Bampidis et al., 2005; Gobbo Neto & Lopes, 2006). As altas concentrações destes compostos e sua relação são de grande importância para a eficácia do produto, porém estudos demonstram que a eficácia de compostos isolados, como timol e carvacrol, não alcançam a mesma eficiência do óleo essencial (Arzila-Lozano et al., 2004). Os precursores biossintéticos como gama-terpineno e p-cimeno, assim como 1,8-cineol, linalol, gama-terpineol influenciam na atividade

antimicrobiana dos óleos, justificando a melhor eficiência do óleo total quando comparado a dos componentes isolados (Tsinas, 1999).

Em vista da diversidade de componentes químicos, o orégano tem sido estudado em busca de propriedades antioxidantes, tanto sob a forma de óleo ou de extratos (hexânico, cetônico ou metanólico), como do emprego direto de suas folhas (Vagi et al., 2005). Devido a presença do anel fenólico e substituintes hidroxila pode funcionar como antioxidantes efetivos, devido a habilidade de neutralizar os radicais livres nocivos, inibindo assim suas reações oxidativas com moléculas biológicas vitais, prevenindo o desenvolvimento de muitas condições fisiológicas, as quais podem se manifestar em doenças (Dorman et al., 2000; Vатtem et al., 2005). A atividade antioxidante do extrato metanólico dessas plantas, combinando com antioxidantes primários, como o butil-hidróxi-anisol (BHA), butil-hidróxi-tolueno (BHT) e palmitato de ascorbil (AP) também foram investigados, demonstrando um efeito antioxidante aditivo desses extratos (Vichi et al., 2001; Vатtem et al., 2005). A ação oxidante de alguns óleos essenciais tem sido atribuída a presença de ácido rosmarínico, devido a este composto possuir quatro grupos hidroxila em sua molécula e, por esta razão, apresentar alto potencial de estabilização de radicais livres (Capecka et al., 2005). Alguns autores, demonstraram que o orégano é também uma fonte potencial de vitamina C e de outros compostos antioxidantes como os carotenóides, sendo encontrado um conteúdo de ácido ascórbico de  $26 \pm 3 \mu\text{M/g}$ , de luteína de  $206 \pm 6 \mu\text{g/g}$  e de zeaxantina de  $44 \pm 1 \mu\text{g/g}$  no óleo essencial do *O. vulgare* (Calucci et al., 2003).

Dentre as propriedades tão destacadas do orégano, pode-se citar ainda sua atividade antimutagênica. Segundo Lam & Zheng (1991), a suplementação de ratos com óleo essencial de *Origanum* proporcionou um aumento na atividade de glutathione S-transferase (GST) nos tecidos analisados, sugerindo atividade anticancerígena, já que o GST exerce um papel importante na detoxificação da carcinogênese química.

Estudos recentes têm buscado a utilização do *Origanum* como conservante de alimentos de origem animal e como promotor de crescimento em várias espécies, com a finalidade de controle de microrganismos e endoparasitas (Giannenas et al., 2003; Bussata, et al., 2007; Oussalah et al., 2007). A suplementação com 600 mg do óleo essencial de orégano emulsificado, na dieta de um grupo de pessoas durante seis semanas, demonstrou eficácia do óleo contra infestações entéricas de parasitas (Force et al., 2000). Na

alimentação animal, o óleo essencial tem demonstrado reduzir a atividade de microrganismos antagonistas no intestino, permitindo uma maior eficiência na absorção de nutrientes pelo animal, podendo representar uma alternativa como promotor de crescimento e como substituinte da adição de antibióticos na ração de aves e suínos (Bilkei et al., 2001; Corrêa et al., 2002; Giannenas et al., 2003). A adição de óleo essencial do *origanum* em testes *in vitro* frente a inúmeras bactérias contaminantes de alimentos, assim como sua adição a lingüiça toscana, demonstrou ação bacteriostática e bactericida deste óleo (Bussata et al., 2007). Inúmeras pesquisas têm demonstrado que a adição do óleo essencial do *O. vulgare* em concentrações variáveis entre 0,625 µl/mL e 3,125 µl/mL, são eficientes como inibidores da atividade bacteriana, assim como causa alterações morfológicas significativas na célula, sendo observando diferenças na sensibilidade entre bactérias Gram negativas e Gram positivas (Baydar et al., 2004; Bertini et al., 2005; Souza et al., 2005; Souza et al., 2006; Bussata et al., 2007; Oussalah et al., 2007).

A atividade antifúngica tem sido avaliada, demonstrando forte inibição do óleo essencial do *O. vulgare* e de outras frações do extrato, frente a diferentes espécies de fungos filamentosos, assim como a ação dos principais componentes do óleo essencial, como timol e carvacrol frente à *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichosporun beigelli*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*, entre outros (Buchanan & Shepherd, 1981; Adam et al., 1989; Tantaoui-Elaraki et al., 1993; Daouk et al., 1995; Garcia et al., 2003). Além de inibir o crescimento fúngico, o *Origanum* spp têm demonstrado ação no metabolismo dos fungos. Estudos realizados por Buchanan & Shepherd (1981), demonstraram que a adição de timol a culturas de *Aspergillus parasiticus* retardou o crescimento exponencial e a produção de aflatoxina pelo fungo. O retardo do crescimento micelial e a germinação do *Aspergillus niger*, *A. flavus* e *A. ochraceus* também foi demonstrado pela adição do *O. vulgare* (Paster et al., 1990). O efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre inibição do crescimento micelial de fungos patogênicos do arroz, foi demonstrado utilizando concentrações de 1:2 a 1:32 do óleo essencial do *O. vulgare* (Zanandrea et al., 2004). Bassílico & Bassílico (1999) verificaram a ação antifúngica do óleo essencial de orégano (100 ppm) através da inibição do crescimento micelial de *Aspergillus ochraceus* e produção de ocratoxina A pelo fungo.



Com relação à atividade antifúngica frente a leveduras de interesse médico, vários estudos têm sido desenvolvidos, porém com grandes variações quanto ao método de análise da suscetibilidade *in vitro*, quanto a modelos experimentais utilizados, composição do óleo essencial, assim como, utilização de compostos isolados em muitas pesquisas (Lambert et al., 2001; Manohar et al., 2001; Chami et al., 2004). Em estudo conduzido por Manohar e colaboradores (2001), as propriedades antifúngicas frente a *C. albicans*, do óleo essencial de orégano obtido comercialmente e do composto carvacrol, foram avaliadas *in vitro*, demonstrando valores de 0.125 mg/mL para *Origanum* e de 0.25 mg/mL para carvacrol, além disso, a administração oral diária de 0,1 mL do óleo puro em camundongos demonstrou ser efetivo na prevenção e tratamento da candidíase sistêmica. Chami e colaboradores (2004), avaliaram *in vitro* e *in vivo* os efeitos do carvacrol e eugenol no tratamento de candidíase, demonstrando valores de concentração de inibitória mínima de 6,5 mM para carvacrol e 12 mM para eugenol, assim como bons resultados foram obtidos no controle da candidíase oral experimental induzido por *Candida albicans* em ratos imunossuprimidos. A atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* com maiores proporções de cariofileno e germacreno-D e do extrato metanólico foi avaliada frente a 15 isolados de fungos incluindo *C. albicans*, sendo que os resultados demonstraram atividade antimicrobiana frente a todas as amostras, em contraste, o extrato de metanol não demonstrou nenhuma atividade inibitória (Sahin et al., 2004).

Mesmo sendo reconhecidas as propriedades antimicrobianas, pertencentes as espécies de *Origanum*, o mecanismo de ação dos extratos e/ou óleo essencial ainda não está completamente elucidado, não se conhecendo o exato modo de ação frente aos fungos, porém diversos estudos tem sido conduzidos neste sentido. Segundo Lambert e colaboradores (2001), a ação antimicrobiana pode ser devido ao prejuízo a diferentes enzimas, principalmente aquelas envolvidas com a produção de energia e/ou síntese de componentes estruturais dos microrganismos. Outra hipótese estudada é de que os óleos essenciais sensibilizam a bicamada fosfolipídica da membrana celular do microrganismo, causando um aumento da permeabilidade e perdas de constituintes intracelulares vitais, ou causando a inibição ou danos nos sistemas enzimáticos (Cox et al., 2000; Singh et al., 2002). Alguns autores sugerem que a alteração na atividade dos canais de cálcio é a causa do aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares, assim como um

decréscimo no ATP intracelular nas células enquanto que, simultaneamente há aumento no ATP extracelular, ocasionando uma ruptura na membrana celular do microrganismo (Helander et al., 1998; Aligiannis et al., 2001; Ponce et al., 2003; Sartoratto et al., 2004).

Em pesquisa desenvolvida por Velluti e colaboradores (2003), foi sugerido que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais está ligada à estrutura de seus componentes, sendo que a presença de um núcleo aromático e um grupo OH fenólico, formariam ligações de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas alvo. Ainda se acredita que núcleos aromáticos, contendo um grupo funcional polar, sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (Sikkema et al., 1994; Milos et al., 2000; Lambert et al., 2001; Porte & Godoy, 2001).

Devido às características intrínsecas do óleo essencial de *Origanum vulgare* e a sua origem natural, este têm sido considerado como de baixo risco, apresentando boa segurança para os consumidores e para o meio ambiente; e por ser composto por uma gama imensa de constituintes, apresenta diferentes mecanismos de atividade antimicrobiana, tornando mais difícil a adaptabilidade dos microrganismos e o desenvolvimento de resistência microbiana frente a sua ação, caracterizando-se como um promissor agente antimicrobiano (Daferera et al., 2000; Souza et al., 2005; Souza et al., 2006).

### **2.3 ANTIFÚNGICOS TRADICIONAIS UTILIZADOS EM VETERINÁRIA**

O conceito de agente antifúngico ou antimicótico é amplo, e engloba qualquer substância capaz de produzir uma alteração na estrutura da célula fúngica, que consiga inibir seu desenvolvimento, alterando sua viabilidade e capacidade de sobrevivência, direta ou indiretamente, podendo ainda facilitar ou estimular os sistemas de defesa do hospedeiro (Tortora et al., 2003; Vargas et al., 2005).

Os fármacos obtidos através de síntese orgânica têm sido utilizados no tratamento de diversas infecções micóticas. Os antisépticos como tintura de iodo, violeta de genciana, ácido salicílico e benzóico, derivados sulfamídicos, corantes, quinonas e os antifúngicos poliênicos foram amplamente usados até a década de oitenta (Farias & Giufreda, 2002; Tortora et al., 2003).

O iodo ainda é utilizado na forma de iodeto de sódio e potássio, porque representa uma alternativa terapêutica de baixo custo no tratamento da esporotricose de cães e felinos,

sendo administrado como solução saturada, por via oral, na concentração de 20%, em dosagens que variam de 10 a 40 mg/Kg, uma a duas vezes ao dia. Entretanto o esquema terapêutico é freqüentemente interrompido devido ao surgimento de reações alérgicas e tóxicas, especialmente em felinos, que é a espécie com maior sensibilidade aos iodetos (Lacaz et al., 2002; Nobre et al., 2002).

A nistatina foi o primeiro antibiótico poliênico a ser isolado do *Streptomyces noursei* em 1949, e até os dias atuais é largamente utilizada no tratamento de candidíase oral ou vaginal, especificamente para uso tópico. Numerosos antibióticos poliênicos têm sido descritos, também a anfotericina B pertence a este grupo, porém poucos são usados como antifúngicos, devido ao alto grau de toxicidade inerente a todos eles (Farias & Giuffrida, 2002). Em medicina veterinária, a nistatina está disponível associada a outros antibióticos para uso tópico, com indicação para o tratamento de otites externas por leveduras como a *Malassezia pachydermatis* (Jaham, 2000).

Em baixas concentrações os antibióticos poliênicos afetam somente as células que contenham esteróis nas membranas celulares, ligam-se ao ergosterol criando poros na membrana citoplasmática do fungo, o que permite a perda de água e eletrólitos, interferem também com as funções de seletividade de membrana, podendo resultar em morte do organismo (Aronso et al., 1992; Farias & Giuffrida, 2002; Nobre et al., 2002).

A partir da década de oitenta, houve um incremento das infecções fúngicas, surgindo novas classes de antifúngicos, conhecidos como azóis. Os fármacos pertencentes ao grupo dos azóis representam a maior classe de antifúngicos utilizados na terapêutica das micoses em medicina veterinária, sendo divididos em imidazoles como cetoconazol e miconazol e os triazoles como fluconazol e itraconazol (Gabal, 1986; Nobre et al., 2002, Tortora et al., 2003).

A estrutura química dos azóis compreende, basicamente, um ou mais anéis azólicos, unidos ao restante da molécula por ligação do tipo C-N. Os imidazóis contêm dois átomos de nitrogênio no anel azólico enquanto que, para os triazólicos, um terceiro átomo de nitrogênio foi introduzido na estrutura (Farias & Giuffrida, 2002). São fármacos de amplo espectro com similar mecanismo de ação, apresentando diferenças quanto à farmacocinética, toxicidade e o uso clínico (Jaham et al., 2000; Nobre et al., 2002).

Os azóis atuam inibindo a síntese do ergosterol na membrana citoplasmática da célula

fúngica por interferência no citocromo P-450. O processo ocorre devido à inibição seletiva da enzima 14 alfa-demetilase, que participa favorecendo a conversão de lanosterol a ergosterol. A substituição do ergosterol por precursores metilados leva a formação de membranas plasmáticas defectivas, com permeabilidade alterada (Farias & Giuffrida, 2002). O resultado deste processo é a desorganização e espessamento do plasmalema, prejudicando a captação dos nutrientes que resulta em necrose celular (Odds et al., 2003, Bergold & Georgiadis, 2004; Fica, 2004). De acordo com o grau de afinidade e seletividade, os azóis interferem com a biossíntese de colesterol, cortisol e testosterona, bem como com o metabolismo hepático (Farias & Giuffrida, 2002). A atividade de outros sistemas enzimáticos como o mecanismo oxidativo e o peroxidativo, também são alterados (Jaham, 2000).

O cetoconazol foi o primeiro antifúngico da classe dos imidazóis usado oralmente no tratamento das micoses sistêmicas, sendo amplamente utilizado em veterinária para o tratamento de dermatofitose (Farias & Giuffrida, 2002). Mostra-se menos efetivo no tratamento de aspergilose e esporotricose. O fármaco apresenta distribuição limitada e sua penetração no líquido cefaloraquidiano é mínima, não sendo recomendado em animais prenhez por ser teratogênico, e em lactantes por ser eliminado no leite. Apresenta metabolização hepática sendo eliminado predominantemente por via biliar (Jaham, 2000; Farias & Giuffrida, 2002).

O itraconazol foi autorizado em 1992 para uso nos quadros de blastomicose, aspergilose e histoplasmose, inclusive em pacientes imunodeprimidos, sendo o fármaco antifúngico mais utilizado na clínica para o tratamento da esporotricose felina, com doses variando de 10 a 40 mg/kg. É recomendado o uso em cães e gatos, para o tratamento da dermatofitose, blastomicose, criptococose e aspergilose nasal em doses variando de 5 a 10 mg/kg (Nobre et al., 2002). A maior especificidade pelas enzimas citocromo P-450 dos fungos, é a principal vantagem do uso do itraconazol, além de não apresentar efeito significativo no metabolismo de andrógenos e cortisol (Fica, 2004). Apresenta rápida absorção e extensa distribuição nos tecidos lipofílicos, atingindo pico plasmático após 3 a 4h, metabolização hepática e excreção biliar e renal (Jaham, 2000; Farias & Giuffrida, 2002).

Apesar de o itraconazol ser considerado um fármaco com reduzida toxicidade em

relação aos outros azóis, tem sido descritos efeitos colaterais como náuseas, vômitos, hipocalemia, hipertensão e cefaléia, sendo contra-indicado em gestantes, lactantes e em pacientes com doença hepática (Bergold & Georgiadis, 2004; Catalan & Montejo, 2006).

O fluconazol foi desenvolvido em 1982 e licenciado em 1990 para uso humano no tratamento da criptococose e candidíase, é um antifúngico triazólico, hidrossolúvel com excelente absorção e meia-vida longa. O baixo peso molecular e a alta solubilidade do fármaco contribuem para a alta biodisponibilidade, o que permite que a maior parte dos pacientes sejam tratados por via oral, recebendo uma dosificação diária de 6 a 12 mg/kg/día (Farias & Giuffrida, 2002; Fica, 2004). O espectro de ação do fluconazol é semelhante ao itraconazol, incluindo micoses superficiais e profundas. Não tem demonstrado atividade contra fungos filamentosos, e a resistência adquirida em certas espécies de *Candida* e *Cryptococcus* tem sido descrita, porém a atividade do fluconazol é reconhecida contra isolados de *C. albicans* e *C. neoformans* var. *neoformans* (Bergold & Georgiadis, 2004; Catalan & Montejo, 2006).

O fluconazol é um dos fármacos de opção para o Sistema Nervoso Central, devido a alcançar bons níveis nos líquidos encefálicos (Fica, 2004; Catalan & Montejo, 2006). O antifúngico está disponível em comprimidos de 5 mg e 100 mg, cápsulas de 150 mg, suspensão oral com 10-40 mg/mL e infusão intravenosa de 2 mg/mL. A duração do tratamento é no mínimo de 6 a 8 semanas, sendo recomendado seu uso por 4 a 6 meses, nos casos de meningite fúngica. Em infecções sistêmicas deve ser administrado diariamente em doses que variam de 100 mg até 400 mg diários por um período indefinido, ressaltando que a aplicação endovenosa não pode exceder a 10 mL/min. As doses usuais para pequenos animais são em média de 2,5 a 5 mg/Kg diariamente (Farias & Giuffrida, 2002). Os efeitos colaterais são esporádicos, demonstrando segurança no uso do fármaco. Sinais gastrintestinais como náuseas, dor abdominal, diarreia, flatulência podendo surgir “rash” cutâneo, eritema e hepatotoxicidade (Fica, 2004). Em medicina humana é o antifúngico mais utilizado em casos de infecções por leveduras do gênero *Candida*, especialmente em pacientes neutropênicos, no entanto, seu uso é restrito nos casos de infecções por *C. krusei*, *C. glabrata* e alguns fungos filamentosos como *Aspergillus* spp. (Fica, 2004; Catalan & Montejo, 2006).

Especificamente em relação à resistência por parte do gênero *Candida*, estudos com isolados da mucosa oral de pacientes com AIDS, demonstraram que 25,42% dos isolados foram resistentes ao itraconazol; 45,76% ao cetoconazol e 66% a fluconazol (Silva et al.; 1998). Em relação à sensibilidade de *Candida tropicalis* frente aos antifúngicos, foi demonstrado 48% de resistência para o fluconazol, 33% para cetoconazol, 17% para 5-fluorocitosona e 17% para o itraconazol (Law et al., 1996).

Em síntese, o número de fármacos disponíveis para o tratamento de infecções fúngicas em medicina veterinária é limitado, além dos freqüentes efeitos colaterais relacionados ao seu uso, restringindo-se aos polienos convencionais, a primeira geração de triazoles, fluconazol e itraconazol (Nobre et al., 2002; Rochete et al., 2003). Mais raramente, anfotericina B tem sido utilizada associada ou não a um derivado azole, como estratégia de segurança e eficácia (Rochete et al., 2003). Apesar do número crescente de relatos de micoses nas diferentes espécies, muitos casos são considerados de pouca importância não sendo realizado o diagnóstico de certeza e o tratamento adequado (Sanglard, 2002; Bergold & Georgiadis, 2004; Vargas et al., 2005), sendo de vital importância a busca por uma terapia adequada nesses pacientes.

## **2.4 FUNGOS OPORTUNISTAS EM MEDICINA VETERINÁRIA**

### **2.4.1 - *CANDIDA* spp**

O gênero *Candida* é atualmente classificado na subdivisão *Deuteromycotina*, classe *Blastomycetes*, ordem *Moniliales*, família *Cryptococcaceae*, sendo constituído por leveduras que têm reprodução assexuada, através da formação de blastoconídios, pseudo-hifas e, ocasionalmente, hifas verdadeiras, algumas espécies do gênero já têm a forma sexuada ou teleomorfa conhecida, como no caso da *Candida guilliermondii* e *C. krusei* que estão classificadas na subdivisão *Ascomycotina*, classe *Hemiascomycetes*, ordem *Endomycetales*, família *Saccharomycetaceae*, gênero *Pichia* e gênero *Issatchenkia* respectivamente (Lacaz et al., 1980; Rippon, 1988; Know-Chung & Bennett, 1992; Sidrim & Moreira, 1999; Lazaz et al., 2002).

No exame direto do material clínico, o gênero apresenta-se em sua forma sapróbia, como uma levedura ovalada, gram positiva com tamanho variável de 2 a 6  $\mu\text{m}$ , e como células alongadas com brotamentos, semelhante a hifas, denominadas pseudo-hifas quando

em parasitismo. No cultivo a 35°C em ágar saboraund dextrose, tem crescimento rápido, entre 24-48 horas, apresentando colônias brilhantes ou opacas, textura cremosa, com bordas regulares ou irregulares, de coloração branca a creme e odor de levedo. Na microscopia caracterizam-se por blastoconídios esféricos (8-12 µm) ou levemente ovais (6-10 µm x 3,6-6 µm), paredes finas e ausência de cápsula, sendo que algumas espécies apresentam clamidoconídios terminais ou intercalares (Sidrim & Moreira, 1999; Lacaz et al., 2002).

A identificação das espécies de leveduras do gênero *Candida* segue alguns critérios básicos como: a produção de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras; fermentação de carboidratos e assimilação de açúcares (Lacaz et al., 2002). Podem-se diferenciar as espécies de *Candida* através da produção de tubo germinativo, utilização das fontes de carbono e de nitrogênio, exigências nutricionais para o cultivo, crescimento a altas temperaturas e suscetibilidade das leveduras frente à cicloheximida (Lacaz et al., 1980; Sidrim & Moreira, 1999).

As principais espécies dentro do gênero são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. Krusei*, *C. lusitaniae*, *C. dubliniensis*, *C. guilliermondii*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea*, *C. curvata*, *C. lambica*, *C. famata*, *C. rugosa* e *C. humicola* (Lacaz et al., 1980; Rippon, 1988; Know-Chung & Bennett, 1992; Sidrim & Moreira, 1999); porém a espécie envolvida na maioria dos casos de candidíase em mamíferos é reconhecidamente *C. albicans*, entretanto espécies não-*albicans*, tem apresentado crescente importância nos quadros clínicos (Kwon-Chung & Bennet, 1992; Sidrim & Moreira, 1999; Ziarrusta, 2002).

*C. albicans* é considerada a espécie com maior potencial patogênico, devido a fatores como formação de hifas, pseudo-hifas e tubo germinativo, além de secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases e proteinases, sendo um fungo leveduriforme quando sapróbia e que assume filamentosa quando invade os tecidos (Lacaz et al., 2002; Schaller et al., 2005; Castro et al., 2006). Esta espécie pode ser antígenicamente dividida em dois sorotipos principais baseados nas diferenças da superfície antigênica definida como A e B. A expressão antigênica na superfície da parede celular de *C. albicans* é um processo muito dinâmico que pode refletir a habilidade do microorganismo de se adaptar ao hospedeiro. A variabilidade pode ser influenciada através de fatores ambientais e nutricionais, como também pela origem (Ferreiro et al., 2002; Sant'ana et al., 2002).

Algumas espécies de *Candida* são consideradas ubíquas de tegumento e mucosas de mamíferos, porém o isolamento do solo e água ocorre devido à contaminação por dejetos humanos e de animais. Apesar da infecção por *Candida* não ser contagiosa, tem sido demonstrado que a transmissão vertical de *C. albicans* ocorre de mãe para filho no momento do parto, enquanto cepas de *C. parapsilosis* são transmitidas por profissionais de saúde (Sidrim & Moreira, 1999; Lacaz et al., 2002).

Em animais as leveduras do gênero *Candida* são isoladas das mucosas vaginal, oral e anal, bem como da pele, meato acústico externo e espaço interdigital, podendo tornar-se patogênicas com o aumento do número de células (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Bornand, 1992; Wilkinson & Harvey, 1996; Carlotti, 1997; Guillot et al., 1996; Sierra et al., 2000; Moreira Jr., 2001).

Embora não seja indicativa de doença, a colonização pelo fungo é fundamental para a instalação da infecção clínica, sendo que a alta concentração do microrganismo está relacionada à maior probabilidade de desenvolvimento de candidíase (Ferreira et al., 1996; Müller & Kirk, 1996; Sidrim & Moreira, 1999). Terapia com antineoplásicos, permanência de dispositivos intravenosos em paciente crítico, pacientes neutropênicos e transplantados; alterações das barreiras anatômicas por traumas, queimaduras, cateterismo, ventilação mecânica; circunstâncias que alterem a microbiota normal, como uso de antibióticos de amplo espectro, os desequilíbrios nutricionais, doenças auto-imunes e metabólicas, endocrinopatias, imunossupressão devido ao uso indiscriminado de antibióticos, glicocorticóides ou fármacos indutores de neutropenia, estão envolvidos nos casos mais graves da doença (Ferreiro et al., 2002; Rodriguez et al., 2003; Cleff et al., 2007). Pacientes idosos, debilitados, recém-nascidos prematuros e/ou desnutridos, e transplantados são mais susceptíveis a enfermidade. Outros estudos citam fatores fisiológicos, como ciclo reprodutivo e gestação, como sendo capazes de alterar a resposta imune local e sistêmica, importante fator para a instalação da candidíase em humanos (Fidel Jr et al., 2000; Fahey & Wira, 2002; Ziarrusta, 2002; Cleff et al., 2005). Todos os fatores citados contribuem para a ocorrência da micose, porém o aumento da incidência de infecções fúngicas por *Candida* spp tem sido descrito especialmente após o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) e com a sobrevivência de pacientes imunocomprometidos (Colombo & Guimarães, 2003).



Em medicina veterinária a multiplicação celular das leveduras é facilitada por alguns fatores como: produção excessiva de cerume no caso de otites, alterações do pH, após terapia antibiótica, glicocorticóides ou fármacos indutores de neutropenia, deficiência nutricional, principalmente de vitaminas e ferro, doenças metabólicas, endocrinopatias (Lacaz et al., 1980; Fotos & Hellstein, 1992; Willense, 1995; Guillot et al., 1996; Sidrim & Moreira, 1999; Brown & Rogers, 2001; Lacaz et al., 2003). O confinamento, o estresse e infecções por outros microrganismos, assim como deficiência na resposta imune mediada por células, podem ser também importantes no desencadeamento da infecção (Lacaz et al., 2002; Ferreira et al., 2003).

As células de *Candida* spp. são capazes de aderirem-se às membranas celulares do hospedeiro, principalmente no trato gastrointestinal, mucosas vaginal e oral, córnea, endotélio vascular e plaquetas. A aderência e penetração nos tecidos estão associadas à virulência das amostras e são devidas ao componente glicoproteico da parede das leveduras, que favorece a inflamação ativando a via alternativa do complemento (Ziarrusta, 2002; Lacaz et al., 2002).

A produção de fosfolipase é considerada um fator importante para o processo de infecção, estando localizada na superfície da levedura e na extremidade do tubo germinativo, atua pela hidrólise dos fosfolipídeos, dando origem aos lisofosfolipídeos que causam dano à célula epitelial; até o momento estudos afirmam que entre as espécies de *Candida*, apenas *C. albicans* é capaz de produzir fosfolipase (Hube et al., 2001; Schaller et al., 2005).

A proteinase extracelular produzida por diferentes espécies de *Candida* é capaz de degradar queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina, cadeia pesada de imunoglobulina e proteínas de matriz extracelular. Enzimas proteolíticas foram encontradas em isolados de *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* obtidas de várias amostras clínicas (Fusek et al., 1993; Zaugg et al., 2001; Schaller et al., 2005).

Os principais fatores envolvidos na patogênese das candidíases são: adesão, penetração e invasão; durante o processo de adesão ocorre a união de uma proteína micótica ao receptor de membrana C<sub>3</sub>b; uma vez aderidas ocorre a germinação dos esporos e a formação das hifas que são responsáveis pela penetração nos tecidos. Este processo de penetração está diretamente relacionado com a produção de proteases, capaz

de destruir proteínas com função de defesa. No processo de invasão epitelial ocorre a liberação de substâncias como prostaglandinas e bradicininas, que induzem a processos inflamatórios locais, levando ao edema, eritema e aumento do fluxo (Ziarrusta, 2002).

Após a multiplicação e invasão dos tecidos, as leveduras do gênero *Candida* podem provocar lesões superficiais em pele e mucosas, assim como se disseminar para diferentes órgãos como rins, pulmão, coração, articulações, ossos e sistema nervoso central. A candidíase apresenta diversas manifestações clínicas de caráter subagudo, agudo ou crônico, que podem ser agrupadas em três formas: cutâneo-mucosa, sistêmica ou visceral, alérgica (Sidrim & Moreira, 1999; Lacaz et al., 2002).

Em medicina veterinária os sinais clínicos da micose dependem da espécie envolvida e da forma de apresentação da micose, sendo que já foram descritos casos em aves, eqüinos, suínos, bovinos, caninos e felinos (Rippon, 1988; Know-Chung & Bennet, 1992; Lacaz et al., 2002). Porém, o trato gastrintestinal (TGI) e reprodutivo (TR) parece ser os mais afetados nos animais de produção, nos quais a infecção pode ocasionar diminuição do crescimento e alta mortalidade em aves jovens. Em potros e leitões são encontradas lesões ulceradas no TGI, ocasionando ruptura e diarreia. Nas éguas, as infecções genitais produzem esterilidade, metrite e aborto, podendo ser observado corrimento vaginal esbranquiçado, prurido e úlceras no trato reprodutivo. Em bovinos de leite a principal forma clínica é a mastite, seguida por problemas reprodutivos; o leite em geral torna-se viscoso e mais escuro havendo uma diminuição na produção (Rippon, 1988; Know-Chung & Bennet, 1992; Lacaz et al., 2002).

Na clínica de pequenos animais tem sido cada vez mais freqüentes os relatos de candidíase, sendo descrito casos de piodermatite das pregas labiais, dermatite mucocutânea localizada e disseminada, otites, infecções do trato urinário e infecções sistêmicas (Mueller et al., 2002; Moretti et al., 2004; Moretti et al., 2006). Na pele as lesões são inicialmente avermelhadas de superfície úmida, em alguns casos há o prurido, presença de pápulas e pústulas, evoluindo para placas e úlceras (Willense, 1995; Lacaz et al., 2002). Nas mucosas observa-se maceração e úlceras recobertas por exsudato esbranquiçado. O gênero *Candida*, na espécie canina, tem predileção por mucosas, junções mucocutâneas, áreas intertriginosas, leito ungueal e áreas interdigitais (Guillot et al., 1996; Raposo et al., 1996),

bem como áreas onde a umidade possa persistir e macerar a pele, como o meato acústico externo e a face dorsal da orelha (Willemse, 1995; Guillot et al., 1996).

Em clínica médica humana *Candida* spp vem sendo amplamente reconhecida como o patógeno oportunista de maior ocorrência (Colombo & Guimarães, 2003), e apontada como principal agente de micoses em pacientes imunodeprimidos em todo o mundo (Nucci et al., 1998; Sant'ana et al., 2002). No Brasil o relato de candidíase humana é muito freqüente, sendo o fungo descrito como causador de micoses oportunistas, colonizando, freqüentemente, pele e membranas mucosas, como na cavidade oral, vaginal e no trato gastrointestinal de pacientes hígidos (Lacaz et al., 1980; Rippon, 1988; Know-chung & Bennett, 1992; Sidrim & Moreira, 1999; Colombo & Guimarães, 2003). A freqüência de isolamento das leveduras do gênero *Candida* em mulheres sadias fica em torno de 20 a 48% em média. A colonização da mucosa vaginal por *Candida* spp pode levar a candidíase vulvovaginal que representa um problema universal, afetando milhões de mulheres em todo o mundo (Ribeiro et al., 2001; Ziarrusta, 2002).

Nas mucosas podem ser observados filamentos micelianos misturados a blastoconídios, associado a infiltrado inflamatório com neoformação capilar. Macroscopicamente podem ser observadas lesões maceradas, exsudativas, ulcerativas, eritematosas e presença de placa esbranquiçada no tegumento cutâneo, unhas, cavidade oral e vaginal (Willense, 1995; Taylor et al., 2005). Na forma sistêmica ou disseminada são observados abscessos e granulomas em diferentes órgãos, especialmente nos rins, podem ocorrer endoftalmites, com lesões esbranquiçadas na retina e vítreo (Sidrim & Moreira, 1999; Lacaz et al., 2002).

Os processos patológicos decorrentes da candidíase são bem variados em função da apresentação clínica da doença, ocorrendo desde irritação e inflamação, até uma resposta granulomatosa e supurativa. O exame das lesões cutâneas demonstra reação inflamatória mista, podendo ter formação de pústulas epidérmicas, espongiose, formação de microvesículas e vesículas, abscessos ou granuloma sérico, sendo caracterizadas como dermatite perivascular (espongiforme ou hiperplásica), dermatite pustular intradérmica (especialmente sub-corneal) ou foliculite (supurativa) (Sidrim & Moreira, 1999, Lacaz et al., 2002).

Nos tecidos, através das técnicas de PAS (Ácido Periódico Schiff) ou Grocott-Gomori, verificam-se estruturas alongadas, tubulares, septadas, formando cadeias, conhecidas como pseudo-hifas, além de blastoconídios que podem estar isolados ou agrupados nas constrições das hifas (Know-Chung & Bennett, 1992; Lacaz et al., 2002).

O aspecto histológico das lesões é caracterizado por intenso infiltrado mononuclear, com predomínio de macrófagos, áreas de necrose e extensa reação fibroblástica, com formação de tecido de granulação. As estruturas fúngicas são mais facilmente visualizadas nos infiltrados de macrófagos ou no interior das células gigantes (Know-Chung & Bennett, 1992; Lacaz et al., 2002).

O diagnóstico presuntivo da candidíase baseia-se na epidemiologia, sinais clínicos, aspecto das lesões e exame direto do material coletado processado em KOH 20% ou por esfregaços corados com Gram ou Giemsa. Na microscopia serão visualizadas células gram positivas, ovaladas e/ou arredondadas, com brotamento e hifas (Know-Chung & Bennett, 1992; Sidrim & Moreira, 1999).

O diagnóstico definitivo é realizado através do cultivo com posterior identificação da levedura. As diferentes espécies de *Candida* podem ser isoladas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, na temperatura de 37°C, com crescimento em 24-48 h. A identificação final passa por várias etapas, como prova do tubo germinativo, microcultivo em ágar fubá, provas fisiológicas de assimilação de fontes carbonadas e nitrogenadas, fermentação de açúcares, inoculação em meios específicos e teste de termotolerância (Sidrim & Moreira, 1999; Lacaz et al., 2002). Atualmente tem se utilizado provas moleculares como o PCR (Reação em Cadeia Polimerase) para identificação das espécies, tendo como vantagens a rapidez e alta especificidade (Moretti et al., 2004; Moretti et al., 2006).

No caso de infecção sistêmica, o diagnóstico baseia-se na visualização e isolamento da levedura em diversos órgãos, ou em espécimes clínicos como na urina, aspirado, biopsia, lavado brônquico e sangue, sendo obrigatória a quantificação da população fúngica (Colombo & Guimarães, 2003)

Provas de precipitação, imunodifusão, aglutinação em látex, radioimunoensaio (RIA) e ELISA podem detectar anticorpos contra *Candida*. Também foram desenvolvidos testes para detecção de antígeno circulante, utilizando métodos imunológicos ou não-

imunológicos. Das técnicas não-imunológicas, tem se utilizado a cromatografia gás-líquido (GLC), que detecta derivado de manose na parede celular ou um subproduto metabólico, D-arabinitol. A detecção de antígeno por métodos imunológicos como ELISA ou RIA tem sido utilizada, porém a aglutinação em látex para antígeno de glicoproteína provou ser o mais útil, embora tenham sido encontrados resultados variáveis (Kano et al., 2001; Lacaz et al., 2002).

Nas candidíases cutâneo-mucosas deve ser realizado diagnóstico diferencial com infecções bacterianas, dermatofitoses, geotricose, malasseziose e neoplasias, enquanto que nos quadros sistêmicos deve ser diferenciada de outras micoses como criptococose, aspergilose e zigomicoses (Guillott et al., 1996; Raposo et al., 1996; Sidrim & Moreira, 1999, Lacaz et al., 2002).

#### **2.4.2 SPOROTHRIX SCHENCKII**

*S. schenckii* pertence à divisão *Ascomycota*, subclasse *Euascmycetes*, ordem *Ophiostomatales*, família *Ophiostomataceae*, gênero *Sporothrix* e espécie *schenckii* (Know-Chung & Bennett, 1992; Lacaz et al., 2002). Várias outras espécies do gênero têm sido descritas, sendo a mais recente conhecida como *Sporothrix cynanescens*, no entanto, o *S. schenckii* é a única patogênica. A forma sexuada do agente não está totalmente definida, embora a análise molecular de seu 18S rRNA forneceu indiretamente como provável forma sexual seja *Ophiostoma stenoceras*, que está relacionado para o *Ascomycetes*.

O *S. schenckii* é considerado saprófita de solo rico em matéria orgânica e celulose, sendo que o seu isolamento foi obtido a partir de cascas de árvores, musgo (*Sphagnum*) e sementes de coníferas (Arenas, 1993; Donadel et al., 1993). A temperatura ambiente ou em condições *in vitro* a 25°C, o agente tem rápido crescimento, apresentando-se como uma colônia inicialmente branca amarelada, sedosa, membranosa, às vezes com micélio aéreo, posteriormente se tornando pregueada e escurecida. Microscopicamente são observadas hifas finas, septadas, ramificadas, medindo 1-2 µm de diâmetro com conidióforos alongados, simpodiais, contendo ápices entumecidos, frutificando conídios hialinos, elípticos ou ovais dispostos em rosetas. Na sua forma parasitária ou quando cultivado a 37°C, a colônia adota forma leveduriforme, com aspecto de colônia bacteriana de coloração cinza ou creme. A micromorfologia do agente evidencia células leveduriformes, pequenas,

ovais ou no formato de “charutos”, com brotamento simples ou múltiplo (Know-Chung & Bennett, 1992; Arenas, 1993; Lacaz et al., 2002).

A característica dimórfica do *S. schenckii* é comprovadamente um dos fatores relacionados à sua virulência, sendo que o dimorfismo lhe confere maior capacidade de proteção frente ao sistema imune do hospedeiro. Outros fatores associados à virulência do agente têm sido descritos como a provável correlação entre a termotolerância e as formas clínicas da micose. Isolados incapazes de crescer a temperaturas superiores a 35 e 37°C, estão associados com lesões cutâneas características com a forma cutânea fixa da micose, enquanto que isolados termotolerantes estariam aptos a desenvolverem-se nos órgãos internos (Know-Chung & Bennett, 1992; Tachibana et al., 1999). A presença da melanina na parede fúngica, confere ao *S. schenckii* proteção celular contra danos químicos e físicos (Romero-Martinez et al., 2000). Em relação ao tempo de cultivo de conídeos, foi observado que os cultivados por um período de quatro dias são mais virulentos, quando comparados com aqueles cultivados há 12 dias, sendo ainda detectados diferenças entre a composição da parede celular desses conídeos. Alguns autores observaram que a forma leveduriforme é mais resistente frente ao peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e neutrófilos em comparação a fase filamentosa do agente (Kajiwara et al., 2004).

A esporotricose é uma micose subcutânea, de evolução subaguda ou crônica, que ocorre em toda extensão geográfica, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (Know-Chung & Bennett, 1992; Davis, 1996; Farias et al., 1997; Lacaz et al., 2002). Normalmente, a infecção com *S. schenckii* ocorre devido à inoculação acidental ou traumática do agente na pele, por espinhos ou material vegetal o que, provavelmente, justifica a maior frequência da enfermidade em jardineiros, agricultores, tratadores de animais, floristas e manipuladores de sementes e mineiros, sendo considerada, portanto, uma micose ocupacional. A infecção pode também ocorrer através da contaminação de feridas abertas, ou da pele com solução de continuidade, por exsudatos provenientes de animais infectados, ou, ainda, mais raramente, pela inalação de conídios resultando em infecção pulmonar (Know-Chung & Bennett, 1992; Davis, 1996; Lacaz et al., 2002).

No Brasil, assim como em outros países, a esporotricose em animais, era considerada micose rara (Larsson et al., 1989; Marques et al., 1993), até os anos 90 o maior número de casos na literatura mundial de esporotricose descrita, foi relatado por Freitas e

colaboradores (1965), com oito casos em felinos e 12 em cães. A partir de 1998, na região sudeste do Brasil, particularmente no Rio de Janeiro, zona litorânea de clima quente e úmido, vem ocorrendo uma epidemia envolvendo felinos domésticos e humanos (Schubach et al., 2003a). Os relatos descrevem casos isolados e atingindo grupos de animais, o que levou ao registro de centenas de animais comprovadamente com esporotricose e conseqüentemente também o registro de casos zoonóticos (Fleury et al., 2001; Nobre et al., 2002; Barros et al., 2004).

A espécie felina está mais frequentemente envolvida nos relatos zoonóticos da esporotricose devido aos hábitos inerentes desses animais de esfregar-se no solo, em cascas de árvores, ou ainda através de mordidas ou arranhões durante brincadeiras e brigas, quando os felinos carregam o fungo e o transmitem para outros animais e ao homem. São relacionados os felinos machos não castrados, com faixa etária em torno dos quatro anos e de livre acesso a rua, como os principais acometidos, isso provavelmente devido à natureza geofílica do fungo e maior exposição desses animais (Dixon, 1991; Donadel, 1993; Farias, 1997; Souza, 2001; Souza et al., 2006). Outro fator relacionado é a presença de grande quantidade de leveduras nas lesões dos animais enfermos. Estudos relatam o isolamento de *S. schenckii* de unhas e cavidade bucal de felinos acometidos com esporotricose (Souza, 2001; Schubach et al., 2001).

Em cães, as formas cutânea-fixa e disseminada da esporotricose são as mais comuns, com lesões geralmente na face, pavilhão auricular, tronco e membros. As lesões são nodulares e ulcerativas, não pruriginosas, com presença de crostas e placas anulares de alopecia (Farias et al., 1997; Schubach & Schubach, 2000).

A esporotricose em eqüinos possui carácter crônico, com nódulos subcutâneos, que ulceram e formam crostas, geralmente localizados nos membros ou no pescoço. No eqüino as principais formas clínicas são: a forma linfática, com linfangite proliferativa, desenvolvendo nódulos ao longo dos vasos, e a forma subcutânea, com múltiplos nódulos no sistema intertegumentário (Copetti et al., 2002).

Os relatos zoonóticos da esporotricose demonstram que o homem pode se contaminar através de arranhadura, mordedura, contaminação por solução de continuidade cutânea preexistente, ou contato direto da pele levemente irritada com lesões ulceradas e

exsudativas dos animais enfermos (Souza et al, 2000; Schubach et al, 2003; Schubach & Schubach, 2000).

A esporotricose felina pode mimetizar outras infecções granulomatosas e neoplasias cutâneas, sendo que as lesões se concentram, principalmente na região cefálica, membros e cauda, podendo ser semelhantes àquelas decorrentes de criptococose, ou, inicialmente, se assemelham às feridas provocadas por brigas, na forma de abscesso, podendo evoluir para lesões necróticas, erosivas, ulceradas e crostosas, sendo que as áreas lesadas, normalmente, são indolores e não pruriginosas (Freitas et al., 1956; Larsson et al., 1989; Wolf & Tray, 1997; Schubach et al., 2003). Dessa forma é imprescindível, para o estabelecimento de um diagnóstico definitivo, recorrer a exames complementares (Dunstan et al., 1986; Lappin, 1993; Scott & Muller, 1996; Lacaz et al., 2002).

A cultura micológica de exsudatos, tecidos ou aspirados de lesões, permite à confirmação do diagnóstico para a esporotricose (Ettinger, 1996), sendo rara a visualização direta do microrganismo em exsudato humano, devido à pequena quantidade do agente fúngico presente (Sherding, 1989). Em felinos o exame citológico frequentemente revela a presença do agente, normalmente esses são polimorfos, podendo estar no interior ou exterior de células. Para o diagnóstico de certeza, o exame micológico é indispensável, sendo que o *S. schenckii* se desenvolve bem no meio de cultura ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol acrescido de cicloheximida, podendo, também, ser cultivado nos meios ágar fubá, infusão cérebro-coração (BHI) e ágar batata, sendo que o dimorfismo do agente pode ser demonstrado quando este é cultivado a 25°C e a 37°C (Know-chung & Bennett, 1993; Lacaz et al., 2002).



**ARTIGO I**

**INFECÇÃO CUTÂNEA EM CÃO POR *Candida albicans***

**PUBLICADO NA REVISTA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**v.14, n.2, p. 164-168, 2007.**

## INFECÇÃO CUTÂNEA EM CÃO POR *Candida albicans*

Cleff<sup>1</sup>, M.B.; Silva<sup>2</sup>, G.M.; Meinerz<sup>1</sup>, A.R.; Madrid<sup>3</sup>, I.M.; Martins<sup>3</sup>, A.A.; Fonseca<sup>3</sup>,  
A.O.; Nascente<sup>1</sup>, P.S.; Meireles<sup>3</sup>, M.C.A.; J.R.B. Mello<sup>1</sup>.

\*<sup>1</sup>Programa de Pós Graduação em Ciências Veterinárias, UFRGS ([emebrum@bol.com.br](mailto:emebrum@bol.com.br)); <sup>2</sup>Médico Veterinário Autônomo, Pelotas, RS. <sup>3</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade Veterinária – UFPel.

### RESUMO

Considerando os escassos diagnósticos de candidíase em pequenos animais, especialmente na região sul do Brasil, o presente estudo tem como objetivo relatar um caso de candidíase cutânea difusa em um cão. O animal descrito tinha 10 anos de idade e apresentava lesões cutâneas exsudativas, alopécicas e úmidas, tendo um histórico de uso de corticosteróides e antibióticoterapia associado à situação de estresse. Foram colhidas amostras das lesões para o exame micológico, o qual confirmou o diagnóstico de candidíase por *C. albicans*. O estudo ressalta os riscos do uso indiscriminado de antimicrobianos e/ou corticosteróides, associados ao estresse, como facilitadores para a instalação de micoses oportunistas.

**Palavras-chave:** Candidíase, *Candida albicans*, cutânea, canino.

### CUTANEOUS INFECTION BY *Candida albicans* IN A DOG

#### ABSTRACT

Considering the low number of candidiasis diagnosis in small animals, mainly in the south area of Brazil, the aim of this report is describe a case of cutaneous candidiasis in a dog. A canine 10-year-old presented exudative, alopecic and humid cutaneous lesions, with a history of glucocorticoid and antimicrobial therapy associated to stress condition. Samples were collected from the lesions for mycological exam that confirmed the candidiasis diagnosis by *C. albicans*. The report emphasizes that the indiscriminate use of antimicrobials and/or corticosteroids and stress are factors that increased the risk of opportunist mycosis development.

**Key words:** Candidiasis, *Candida albicans*, cutaneous, dog.

## INFECCION CUTÁNEA EN UN PERRO DEBIDO A *Candida albicans*

### RESUMEN

Teniendo en cuenta los escasos diagnósticos de la candidiasis en los animales de compañía, especialmente en la region sur de lo Brasil, los autores describen un caso clínico de candidiasis cutánea en un perro. Una hembra, 10 años, presentando lesiones cutáneas exsudativas, alopécicas y húmedas, habia historia del uso de corticosteroides y antibioticoterapia por un largo periodo, e la presencia concomitante de una situação de estrés. Fueron recogidas muestras de las lesiones para el examen micológico, que confirmó el diagnóstico de la infección micótica por *Candida albicans*. El estudio enfatiza que el uso indiscriminado de los antimicrobianos y corticosteroides de amplio espectro, asociados a estrés, son factores que incrementón el riesgo del desarrollo de micosis oportunistas.

**Palabras-clave:** Candidiasis, *Candida albicans*, cutaneous, perro.

### INTRODUÇÃO

A candidíase é uma infecção primária ou secundária decorrente da infecção por leveduras do gênero *Candida*. Estes fungos estão amplamente distribuídos, sendo considerado comensal da pele e mucosas de mamíferos, apresentando-se como patógeno oportunista em diferentes espécies animais e no homem (GUILLOT et al., 1996; LACAZ et al., 2002; CLEFF et al., 2005). São reconhecidas em torno de 200 espécies dentro deste gênero, das quais aproximadamente, 20 são consideradas patogênicas. Devido a fatores como formação de hifas/pseudo-hifas e tubo germinativo, possibilidade de troca de classe, além de secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases e proteinases, *Candida albicans* é considerada a espécie de maior patogenicidade (COSTA et al., 1985; MORETTI et al., 2004; TAYLOR et al., 2005), porém trabalhos recentes confirmam o envolvimento de espécies não-albicans em casos clínicos em humanos e animais (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2006).

O aumento da incidência de infecções fúngicas por *Candida* spp tem sido descrito especialmente, em pacientes imunocomprometidos, porém fatores que alterem o equilíbrio parasita-hospedeiro favorecem a instalação da micose (GUILLOT et al., 1996; LACAZ et al., 2002). Alterações nutricionais e/ou hormonais, fatores fisiológicos, além de doenças autoimunes e metabólicas, diabetes, endocrinopatias, uso indiscriminado de antibióticos,

glicocorticóides ou fármacos indutores de neutropenia, tem sido citados como principais envolvidos nos casos graves da micose (RAPOSO et al., 1996; FERREIRO et al., 2002; LACAZ et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2003; MORETTI et al., 2004, 2006).

Apesar do aumento na incidência e fatalidade de candidíase humana, os relatos em medicina veterinária são escassos, sendo encontrados poucos casos na literatura envolvendo animais de companhia. Nesse contexto, o estudo teve como objetivo descrever um caso de candidíase cutânea canina causada por *Candida albicans*.

## **RELATO DO CASO**

Uma fêmea canina Dachshund (Teckel), 10 anos de idade, apresentando extensas lesões cutâneas há aproximadamente um ano, foi atendida em uma Clínica Veterinária de Pelotas-RS. Durante a anamnese foi relatado que as lesões haviam surgido após o animal ter passado por situações de estresse, com sucessivas trocas de donos e histórico de tratamentos com antibióticos e corticosteróides, vindo a apresentar melhora das lesões durante o uso dos quimioterápicos, mas com freqüentes episódios de recidiva e agravamento do quadro clínico inicial.

No exame clínico o animal apresentava-se obeso, temperatura e hidratação dentro dos parâmetros normais para a espécie e mucosas pálidas. No tegumento cutâneo havia extensas lesões úmidas e eritematosas na região ventral, inguinal e pescoço, além de lesões descamativas na região lombar, membros e face. Segundo informações do proprietário, as lesões se desenvolveram após um período de intensa apatia do animal.

Foram coletadas amostras de exsudato e crostas da pele por raspado cutâneo, carpe e zaragoas estéreis, as quais foram encaminhadas para Faculdade de Veterinária – Departamento de Veterinária Preventiva – Setor de Micologia. As amostras foram submetidas ao exame direto a partir de crostas e esfregaço do exsudato, corado pela técnica de Gram, e cultivadas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e incubados à 37°C. Após o crescimento da levedura no meio de cultivo inicial, foi realizado o microcultivo em ágar fubá acrescido de Tween 80 para a visualização da possível filamentização e presença de clamidoconídios, sendo realizado prova do tubo germinativo e cultivo em meio CHROmagar.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

No exame direto das amostras das lesões muco-cutâneas, não foram observadas leveduras, no entanto no cultivo de exsudato e crostas observou-se o crescimento de colônias cremosas, brilhantes, com superfície lisa e de coloração branca, compatíveis com as características macroscópicas descritas para leveduras do gênero *Candida* (LACAZ et al., 2002). Na análise microscópica das colônias, foram observadas células leveduriformes com formato oval ou alongada e brotamento unipolar. A formação de tubo germinativo em albumina de ovo foi positiva, e no microcultivo em ágar fubá com tween 80 observou-se a presença de clamidoconídios globosos terminais, de parede celular espessa, e a presença de pseudomicélio abundante e ramificado. O cultivo em meio CHROMagar revelou colônias brilhantes de coloração verde confirmando a espécie como *C. albicans*.

As lesões cutâneas observadas no animal apresentaram-se inicialmente úmidas e eritematosas com formação de crostas e extensas áreas alopecicas. Esta sintomatologia foi condizente com o descrito por outros autores para a candidíase muco-cutânea em pequenos animais, onde observaram lesões pruriginosas, ulcerativas e exsudativas, com bordas irregulares (COSTA et al., 1985; RAPOSO et al., 1996; MORETTI et al., 2004, 2006) . Outros estudos sugeriram que a distribuição das lesões ocorre preferencialmente na região intercostal, pregas mucocutâneas e região cervical (GUILLOT et al., 1996; MORETTI et al., 2006).

Os primeiros sinais clínicos observados no animal foram apatia e depressão, seguidos de dificuldade na alimentação, evoluindo posteriormente para um quadro de dermatopatia crônica. Alguns autores têm associado manifestações clínicas como apatia, mucosas pálidas e linfonodos aumentados, com a maior probabilidade de isolamento de *C. albicans* (FERREIRO et al., 2002).

O cão envolvido no estudo foi submetido a tratamento com antibacterianos e corticoesteróides local e sistêmico por mais de seis meses. Além do histórico de tratamento quimioterápico, o animal sofreu mudança de ambiente e de proprietários, gerando uma situação de estresse o que provavelmente propiciou a proliferação das células leveduriformes na superfície corpórea, e o desenvolvimento da candidíase. A colonização de pele e mucosas por *C. albicans* em indivíduos sadios é relativamente comum, porém a

instalação da micose com invasão tecidual está normalmente associada à deficiência na resposta imune, que pode ser influenciada por fatores endógenos e/ou exógenos (RAPOSO et al., 1996; FERREIRO et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2003; MORETTI et al., 2004; CLEFF et al.; 2005). Conforme Ferreiro et al. (2002), a administração de antibióticos e/ou corticosteróides até 60 dias antes da coleta de amostras, influencia significativamente no isolamento de *C. albicans* no tegumento cutâneo de felinos, sendo estes fármacos associados frequentemente ao desenvolvimento de candidíase em caninos (RAPOSO et al., 1996; MORETTI et al., 2004; 2006). Trabalhos em humanos demonstram que a aderência de *C. albicans* às células epiteliais orais é significativamente maior em crianças sob antibioticoterapia (COX, 1983).

Após a confirmação do diagnóstico de candidíase, foi recomendado pelo clínico veterinário, o uso de cetoconazol via oral, na dose de 10mg/Kg a cada 12 horas, associado aos banhos semanais com “shampoo” de cetoconazol, por um período de 30 dias, ocorrendo uma melhora gradativa das lesões após terapia antifúngica (Figuras 1 e 2). Apesar dos relatos de resistência com o uso dos azóis e dos novos antifúngicos disponíveis para o tratamento da candidíase, o cetoconazol é um dos fármacos mais freqüentemente utilizado em clínica de pequenos animais, representando uma alternativa economicamente viável e com várias apresentações para uso veterinário, além de ser indicado para terapia de micoses crônicas em diversas espécies (FARIAS & GIUFFRIDA, 2002).



**Figura 1:** Lesões cutâneas em região inguinal, membros e face de Cão Dachshund, após 10 dias de uso do antifúngico.



**Figura 2:** Lesões cutâneas em cão Dachshund, após 20 dias de uso do antifúngico.

## CONCLUSÃO

O trabalho salienta que o uso indiscriminado de fármacos que alterem as barreiras naturais de defesa dos animais, como antibióticos e corticosteróides associados ao estresse, podem facilitar a multiplicação fúngica, propiciando a instalação de micoses oportunistas como a candidíase.

## REFERÊNCIAS

- CLEFF, M.B. et al. Isolation of *Candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Braz. J. Microbiol.**, v.32, p.201-204, 2005.
- COSTA, E.O. et al. Dermatose por *C. albicans* em cão. **Rev. Microbiol.**, v.16, p.113-116, 1985.
- COX, F. Adherence of *Candida albicans* to buccal epithelial cell in children and adults. **J. Lab. Clin. Med.**, v.102, p.960-972, 1983.
- FARIAS, M.R.; GIUFFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Manole, 2002. p.59-70.
- FERREIRO, L. et al. Associação entre o isolamento de *Candida albicans* com a infecção pelo Vírus da leucemia Felina (FeLv). Tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Sci. Vet.**, v.30, p.179-183, 2002.
- GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; MAILLARD, R. Les candidoses des carnivores domestiques actualisation à propos de 10 cas. **Point Vet.**, v.28, p.51-61, 1996.
- LACAZ, C.S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002. p.1104.
- MORETTI, A. et al. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnostic by PCR-REA. **Rev. Iber. Micol.**, v.21, p.139-142, 2004.
- MORETTI, A. et al. Co-cutaneous infection in a dog: per-reverse identification of *C. tropicalis* on skin biopsy. **J. Mycol. Med.**, v.16, p.30-36, 2006.
- MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous Candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. **Vet. Rec.**, v.150, p.728-730, 2002.
- RAPOSO, J.B. et al. Candidíase cutânea em um canino. **Rev. Fac. Zootec. Vet. Agron. Urug.**, v.2/3, p.11-14, 1996.
- RODRIGUEZ, M.C. et al. Immunocompetence of macrophages in rats exposed to *Candida albicans* infection and stress. **Am. J. Physiol. Cell.**, v.284, p.111-118, 2003.
- TAYLOR, B.N. et al. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited during vaginal infection. **Infect. Immun.**, v.73, p.1828-1835; 2005.



**ARTIGO II**  
**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DO *ORIGANUM VULGARE***  
**FRENTE AO *SPOROTHRIX SCHENCKII*.**

**ACEITO PARA PUBLICAÇÃO**  
**v. 60, n. 2, p. 513-516, 2008.**  
**ARQUIVOS BRASILEIROS DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA**

**ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DO *ORIGANUM VULGARE*  
FRENTE AO *SPOROTHRIX SCHENCKII***

M. B. Cleff<sup>1</sup>, R.M. Meinerz<sup>1</sup>, L.F.D. Schuch<sup>1</sup>, M.R.A. Rodrigues<sup>2</sup>, M.C.A. Meireles<sup>2</sup>,  
J.R.B. Mello<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias - UFRGS – Porto Alegre, RS.

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – Pelotas, RS.

**RESUMO**

Foi avaliada a atividade *in vitro* do óleo essencial do *Origanum vulgare* frente a *Sporothrix schenckii* determinando a CIM (Concentração Inibitória Mínima). Para isto, foram estudados sete isolados de *S. schenckii*, dois procedentes de esporotricose humana e cinco isolados de felinos. A análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa (GC/FID), para identificação e quantificação de timol e carvacrol (agentes antifúngicos). A CIM foi obtida por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento NCCLS-M27A2 adaptada a um fitofármaco. Todos isolados testados apresentaram sensibilidade ao óleo essencial, o *S. Schenckii* foi inibido na concentração de 0,25% (250 µL/mL). Na análise cromatográfica, foi observada maior concentração de timol em relação ao carvacrol. A atividade antifúngica demonstrada pelo *O. vulgare* frente ao *S. schenckii* estimulam o desenvolvimento de novas pesquisas, incluindo estudos *in vivo*.

**Palavras-chave:** *Origanum vulgare*; *Sporothrix schenckii*; orégano; tratamento.

**ACTIVITY *IN VITRO* OF THE ESSENTIAL OIL OF *ORIGANUM VULGARE*  
AGAINST TO *SPOROTHRIX SCHENCKII***

**SUMMARY**

*In vitro* activity of the essential oil *Origanum vulgare* against *Sporothrix schenckii* was determined by the MIC (Minimum Inhibitory Concentration). For this, seven samples of *S. schenckii* were studied, two isolated from two cases of human sporotrichosis and five isolated from cats. Analysis of the essential oil was carried out in a gas chromatograph (GC/FID) for the identification and quantification of thymol and carvacrol (antifungal agents). MIC was obtained based on the microdilution method according to the adapted

document NCCLS-M 27A2 for fitopharmacy. All the isolates presented sensibility to the essential oil. *S. schenckii* was inhibited in a concentration of 0.25% (250µl/ml). Chromatographic analysis showed that thymol concentration was bigger than carvacrol. The antifungal activity demonstrated by the essential oil of *O. vulgare* against *S. Schenckii* stimulates the accomplishment of more studies, including in vivo studies.

**Key-Words:** *Origanum vulgare*; *Sporothrix schenckii*; *origanum*; treatment.

## 1-INRODUÇÃO

A esporotricose, micose subcutânea causada pelo fungo geofílico *Sporothrix schenckii*, apresenta distribuição mundial, principalmente nas regiões tropicais e subtropicais, acomete o homem e várias espécies de animais. A espécie felina está freqüentemente envolvida nos relatos zoonóticos, em que a transmissão do agente ao homem ocorre por meio de arranhaduras, mordeduras ou por contato direto com as lesões de felinos com esporotricose. Estudos sugerem que a transmissão é facilitada pela grande quantidade de leveduras nas lesões desses animais, assim como a presença de microrganismos nas unhas e na cavidade bucal (Barros et al., 2004; Souza et al., 2006).

Em relação ao tratamento da esporotricose, os iodetos foram as primeiras substâncias utilizadas para as formas cutâneas e linfocutâneas da micose (Schubach et al., 2004; Catalán e Montejo, 2006). Na década de noventa, o itraconazol, antifúngico do grupo dos triazóis, emergiu como alternativa terapêutica eficaz, com reduzidos efeitos adversos e foi considerado o tratamento de eleição para felinos (Catalán e Montejo, 2006). No entanto, alguns autores têm relatado a ocorrência de falhas terapêuticas com o uso do itraconazol para tratamento de felinos com esporotricose (Schubach et al., 2004).

A pesquisa de substâncias ativas oriundas das plantas tem despertado interesse, em função da grande diversidade de compostos com possível ação antimicrobiana. Dentre as diversas espécies avaliadas quanto à ação terapêutica, destaca-se o *Origanum vulgare*, que é amplamente utilizado na culinária e na medicina popular. O seu óleo essencial apresenta alta estabilidade, ausência de contaminação microbiológica e diversidade de componentes químicos, principalmente o carvacrol e o timol, com atividade antimicrobiana comprovada (Lambert et al., 2001; Baydar et al., 2004). Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Sporothrix schenckii*.

## MATERIAL E MÉTODOS:

Amostras de orégano comercial (*O. vulgare*) de origem chilena foram submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988), para obtenção do óleo. Após a extração, o óleo foi seco em sulfato de sódio anidro (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), e concentrado sob N<sub>2</sub> ultra puro (99,9%), armazenados em frascos âmbar e mantidos sob refrigeração.

O óleo essencial de *O. vulgare* foi analisado em cromatógrafo a gás com detector de ionização de chama (GC/FID), e caracterizado em função do conteúdo de compostos fenólicos, timol e/ou carvacrol. Para isso, foi preparada uma solução do óleo a 5000mg/l em hexano e soluções de 40mg/l dos padrões:  $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -terpinemo, *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol,  $\gamma$ -terpineno, terpinoleno, linalol, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, timol, carvacrol, das quais foram injetadas 1 $\mu$ l. Os constituintes foram identificados por comparação entre o tempo de retenção desses padrões e das amostras. Para o teste de suscetibilidade ao óleo essencial, foram utilizados sete isolados de *S. schenckii*. As amostras foram provenientes de esporotricose cutânea de felinos (n=5) e de esporotricose humana (n=2), estocadas na micoteca do laboratório de micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Os isolados foram mantidos na sua fase miceliana a partir de subculturas em tubos contendo meio Brain de 4°C, realizando-se subcultivos com intervalos de seis meses.

A suscetibilidade de *S. schenckii* ao óleo foi avaliada por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o protocolo descrito no documento NCCLSM27-A2, que descreve a técnica de suscetibilidade antifúngica frente aos fungos leveduriformes adaptada para um fitofármaco.

O óleo foi submetido a uma série de nove diluições em logaritmo de base 2, no meio sintético RPMI 1640, acrescido do tampão de ácido morfolino propanosulfônico, obtendo-se óleo em concentrações de 2,0 até 0,004%. Essas concentrações foram distribuídas no sentido das colunas das microplacas em volumes de 100 $\mu$ l.

Os inóculos fúngicos, referentes aos isolados testados, foram preparados a partir de colônias jovens (48-72h) da fase leveduriforme de *S. schenckii*, as quais foram ressuspensas em tubos contendo solução salina estéril, homogeneizadas em agitador e ajustadas à turbidez 0,5 da escala de MacFarland. A suspensão fúngica foi diluída em solução salina

(1:50), homogeneizada, e submetida à diluição em meio RPMI 1640 (1:20). O inóculo foi distribuído no sentido das linhas das microplacas em volumes de 100µl.

Os testes de suscetibilidade ao óleo foram realizados em duplicata, sendo uma coluna da microplaca utilizada para o controle positivo (RPMI 1640 e inóculo fúngico) e outra coluna para o controle negativo (RPMI 1640). As microplacas foram incubadas a 35°C sob agitação branda (40 ciclos/min) por até cinco dias, quando foi realizada a leitura da concentração inibitória mínima (CIM). A CIM foi obtida pela comparação visual do crescimento do agente ocorrido nos poços referentes às diferentes concentrações testadas, com o seu crescimento no controle positivo. A menor concentração capaz de produzir proeminente inibição do crescimento da levedura em relação ao controle-positivo foi identificada como a CIM do óleo essencial para *S. schenckii*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A CIM do óleo essencial do orégano para *S. schenckii* foi de 0,25% (250µl/ml), para todos os isolados testados. Outros estudos comprovaram a atividade *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*, *Penicilium italicum* e *Fusarium oxysporum* (Buchanan e 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). Não foi, todavia, avaliada a sua atividade frente ao *S. schenckii*.

A homogeneidade observada para os valores da CIM foi diferente do que se observa em avaliação de substâncias antifúngicas puras, nas quais se verifica grande amplitude entre os valores da CIM. Esse fato explica-se, provavelmente, pela diversificada composição química do óleo essencial, que dificulta a utilização pelos microrganismos de rotas metabólicas alternativas que lhe confirmam maior ou menor resistência, como ocorre nos casos de princípios ativos isolados (Rios et al., 1988).

Em relação aos compostos detectados pela análise cromatográfica da amostra de orégano utilizada, observou-se maior concentração de timol em relação ao carvacrol (Fig.1). Mesmo sendo reconhecidas as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de *Origanum* spp, ainda não foi possível determinar com clareza o mecanismo de ação que

justifique essa atividade. Acredita-se que a ação antimicrobiana possa ser decorrente da alteração de diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas com a produção de energia e a síntese de componentes estruturais. Em geral, o estudo do mecanismo de ação dos óleos essenciais tem usado metodologia comum na tentativa de ilustrar os efeitos prejudiciais que ocorrem na membrana celular (Lambert et al., 2001).

### CONCLUSÕES

O óleo essencial do *O. vulgare* demonstrou atividade *in vitro* frente ao *S. schenckii* utilizando a técnica de microdiluição em caldo adaptada a um fitofármaco, o que justifica mais análises com o óleo do orégano, incluindo estudos *in vivo*.

### REFERÊNCIAS

- AJAIYEGBA, E. O. Comparative phytochemical and antimicrobial studies of *Solanum macrocarpum* and *S. torvum* leaves. *Fitoterapia*, v. 70, p. 184-186, 1999.
- BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; DO VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. *Clinical Infectious Diseases Society of America*, v. 38, p. 529-535, 2004.
- BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, v. 15, p. 169-172, 2004.
- BUCHANAN, R. L.; SHEPHERD, A. J. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by timol. *Journal Food Science*, Chicago, v. 46, p. 976-977, 1981.
- CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. *Rev Iberoam Micol*, v. 23, p. 39-49, 2006.
- CHAMI, F.; CHAMI, N.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Evaluation of carvacrol and eugenol as prophylaxis and treatment of vaginal candidiasis in an immunosuppressed rat model. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.54, n.5, 909-914, 2004.
- DAOUK, R. K.; DAGHER, S.; SATTOUT, E. Antifungal activity of essential oil of *Origanum syriacum* L. *Journal of Food Protection*, Iowa, v. 58, p. 1147-1149, 1995.

- GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAL,C.; ABOU,L.; PORTUGAL,H. Antifungal effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytotherapy Research*, 18, 990-995, 2004.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p. 453-462, 2001.
- 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. *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p. 453-462, 2001.
- MANOHAR, V; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of Origanum oil against *Candida albicans*. *Molecular and Cellular Biochemistry*. 228, 111-117, 2001.
- PASTER, N.; JUVENT, B. J.; SHAAYA, E.; MENASHEROV, M. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on mould and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. Oxford: Bacwell Scientific Publications, v. 11, n. 1, p. 33-37, 1990.
- RODRIGUES, M. R. A Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano. Tese de Doutorado, UFRGS, 2002, 163p.
- RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. *Journal of Athnopharmacology*, Lausanne, v. 23, p. 127-149, 1988.
- SCHUBACH T. M. P, SCHUBACH, A. O, KAMOTO BARROS, T. M. B. L, FIGUEIREDO, F. B, CUZZI, T, FIALHO-MONTEIRO, P. C, REIS, R. S; PEREZ, M. A. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 224, p. 1623-1629, 2004.
- SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. *Brazilian Journal Microbiology*, v. 37, p. 303-305, 2006
- TANTAOU-ELARAKI, A.; FERHOUT, H.; ERRIFI, A. Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. *Journal Essencial Oils Research*, v. 5, n. 5, p. 535-543, 1993.

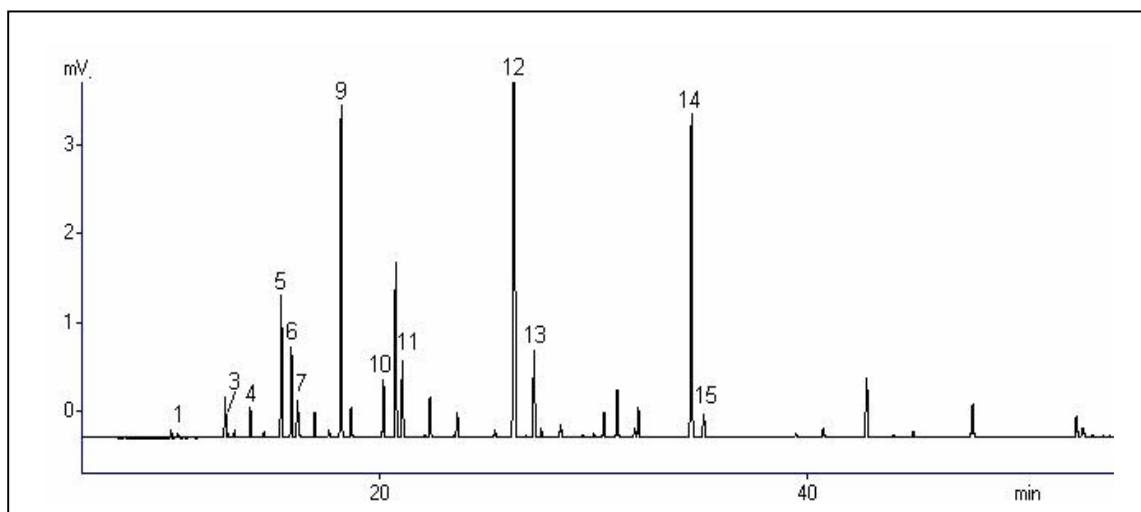


Figura 1 - Cromatograma correspondente a amostra do óleo essencial de orégano, preparado em solução de  $5000 \text{ mg L}^{-1}$  em hexano. Picos dos padrões: 1.  $\alpha$ -pineno; 2. canfeno; 3.  $\beta$ -pineno; 4. mirceno; 5.  $\alpha$ -terpinemo; 6. *p*-cimeno; 7. limoneno; 8. 1,8-cineol; 9.  $\gamma$ -terpineno; 10. terpinoleno; 11. linalol; 12. 4-terpineol; 13.  $\alpha$ -terpineol; 14. timol; 15. carvacrol.



**ARTIGO III**

**ÓLEO ESSENCIAL DO *ORIGANUM VULGARE* FRENTE À *CANDIDA* SPP:  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE OITO AMOSTRAS COM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE TIMOL/CARVACROL**

Formatado segundo as normas da revista

Applied of Microbiology

**ÓLEO ESSENCIAL DO *ORIGANUM VULGARE* FRENTE À *CANDIDA* SPP:  
AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE OITO AMOSTRAS COM DIFERENTES  
CONCENTRAÇÕES DE TIMOL/CARVACROL**

CLEFF, M.B.<sup>1</sup>; MEINERZ, A.R.M.<sup>1</sup>; NASCENTE, P.S.<sup>3</sup>; LELLING, J.<sup>2</sup>; CABANA, A.<sup>2</sup>; MEIRELES, M.C.A.<sup>3</sup>; RODRIGUES, M.R.<sup>4</sup>; J.R.B., MELLO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, UFRGS;emebrum@bol.com.br;  
<sup>2</sup>Iniciação Científica. Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, UFPel;  
<sup>3</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel; <sup>4</sup>Departamento de Química Orgânica, UFPel.

**RESUMO**

As pesquisas avaliando a ação do óleo essencial de *Origanum vulgare* têm demonstrado atividade antimicrobiana frente a diferentes patógenos, sendo esta atribuída aos compostos fenólicos, como carvacrol e timol. Considerando a importância na clínica médica da candidíase, o objetivo do estudo foi avaliar a ação *in vitro* de oito óleos essenciais de *O. vulgare* frente a *Candida* spp., levando em consideração a razão molar timol/carvacrol. Os microrganismos utilizados foram doze isolados, destes nove eram *C. albicans* (cinco isolados clínicos e quatro isolados padrões-ATCC), e três eram isolados padrões de espécies não-albicans. A técnica de microdiluição em caldo (NCCLS-M27A2-CLSI), foi utilizada para avaliar a susceptibilidade do óleo frente a *Candida* spp.. Os inóculos fúngicos foram obtidos a partir de colônias jovens da levedura e ajustados a escala 0,5 de MacFarland. Oito amostras (OE1 a OE8) de *O. vulgare* comercial foram adquiridas em distribuidores e submetidas à hidrodestilação em aparelho Clevenger. O óleo essencial obtido foi analisado por cromatografia gasosa (GC/FID), e os compostos foram identificados por comparação com o tempo de retenção de padrões terpênicos. Os óleos analisados apresentaram as seguintes concentrações em relação a razão molar timol/carvacrol: OE1- 10,20/12,67; OE2 – 7,88/0,50; OE3 – 6,18/0,71; OE4 – 0,58/21,58; OE5 – 20,62/1,34; OE6 – 21,95/4,71; OE7 – 16,68/0,77; OE8 – 8,42/9,44. Todos os óleos avaliados inibiram o crescimento das leveduras *in vitro*, em concentrações que oscilaram entre 1,0 e 0,125%, porém os óleos OE1 e OE8 foram aqueles que apresentaram melhores resultados frente as espécies de *Candida* avaliadas. Portanto, os resultados demonstram que as diferenças entre as concentrações de timol/carvacrol influenciaram na CIM do óleo do *O.*

*Vulgare* frente às leveduras estudadas, assim como o equilíbrio das concentrações dos compostos fenólicos, timol e carvacrol, parece ter um efeito sinérgico e positivo na inibição do crescimento de diferentes espécies de *Candida*.

PALAVRAS-CHAVE: *Origanum vulgare*, óleo essencial, timol, carvacrol, *Candida*.

## ABSTRACT

Research about the action of *Origanum vulgare* essential oil has demonstrated microbial activity against different pathogens, being attributed to phenolic compounds, mainly carvacrol and thymol. Considering the importance in the medical clinic of candidiasis, the objective of this study was to evaluate the action *in vitro* of eight *O. vulgare* essential oils against *Candida* spp. in relation to the molar ratio thymol/carvacrol. The microorganisms were twelve isolates, being nine *C. albicans* (five proceeding from clinical cases and four isolated standards ATCC), and three isolates of species no-albicans. The microdilution in broth technique (NCCLS-M-27A2 or CLSI) was used to evaluate the susceptibility of the oil against *Candida* spp. The fungi inoculums were obtained of young yeast colonies and adjusted to scale 0.5 of MacFarland. Eight samples (EO1 to EO8) of commercial *O. vulgare* was acquired in markets and submitted to hidrodistillation extraction in a Clevenger apparatus. Essential oils obtained were analyzed in a gaseous chromatograph (GC/FID) and main compounds were identified by comparison with retention time of terpenes standards. The results based in relation to thymol/carvacrol ratio were: EO1- 10.20/12.67; EO2 – 7.88/0.50; EO3 – 6.18/0.71; EO4 – 0.58/21.58; EO5 – 20.62/1.34; EO6 – 21.95/4.71; EO7 – 16.68/0.77; EO8 – 8.42/9.44. All of the evaluated chemotypes inhibited the growth of the yeasts *in vitro*, in concentrations that were varied of 1.0 to 0.125%, however oils EO1 and EO8 were those that presented better results against the evaluated species of *Candida*. Therefore, the results demonstrate that the differences between the concentrations of thymol and carvacrol influenced in the concentration inhibitory minimum (CIM) of the *O. vulgare* oil against to the yeast studied. As well as the balance of the concentrations of phenolic compounds, thymol and carvacrol, seem to have a synergic and positive effect in the inhibition of the growth of different species of *Candida*.

**KEY-WORDS:** *Origanum vulgare*, essential oil, thymol, carvacrol, *Candida*.

## 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (Simões et al., 2003; Pinto et al., 2002). Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais das residências (Porte & Godoy, 2001; Simões et al., 2003).

Em relação à atividade antimicrobiana os vegetais da família *Lamiaceae* tem despertado interesse devido ao seu potencial, muitas das espécies desta família, introduzidas no Brasil, são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas também como condimentos ou como flores ornamentais, destacando-se o *Origanum vulgare*. (Arango et al., 2004; Rheder et al.; 2004; Rodrigues et al., 2004). Os constituintes mais importantes do óleo essencial desta planta são os terpenos, sendo que destes os mais encontrados no óleo são os monoterpenos e os sesquiterpenos (Lambert et al., 2001; Arango et al., 2004; Rodrigues et al., 2004; Busatta et al., 2007). Os estudos com o propósito de detectar a ação do óleo essencial do *Origanum vulgare* tem demonstrado boa atividade bactericida e fungicida contra diferentes patógenos, sendo essa, atribuída aos compostos carvacrol e timol, que são os constituintes químicos majoritários em alguns óleos (Arango et al., 2004; Baydarh et al., 2004; Chami et al., 2004; Hsieh et al., 2001; Rodrigues et al., 2004; Bussata et al.; 2007).

Atualmente, devido a maior frequência de pacientes imunodeprimidos, e, portanto suscetíveis às infecções fúngicas, se têm observado um maior número de relatos de isolados resistentes aos antifúngicos, assim como, o maior índice de falhas terapêuticas, principalmente nas candidiases (Mueller et al., 2002; Santos Jr. et al., 2005; Magill et al., 2006). Essa micose tem sido frequentemente associada à infecções hospitalares em imunodeprimidos, sendo que em medicina veterinária é crescente sua importância ocorrendo vários relatos da enfermidade em animais (Raposo et al., 2006; Mueller et al., 2002; Moretti et al., 2004; Cleff et al.; 2007). Considerando a variabilidade da composição química do óleo essencial do *O. vulgare* (Gobbo Neto & Lopes, 2006), assim como a importância na clínica médica da candidiase, este estudo objetiva avaliar a ação *in vitro* de oito óleos essenciais de *O. vulgare* frente a leveduras do gênero *Candida*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Amostras de *O. vulgare***

As amostras de orégano foram obtidas através de distribuidores comerciais, as quais forneceram laudos de certificação botânica. Para o estudo foram avaliadas oito amostras de orégano com origem chilena e uruguaia, levando em consideração a razão molar timol/carvacrol. As amostras foram numeradas e nomeadas da seguinte maneira: 1- Erechim; 2- Aves; 3- El Moncayo; 4- La Rosa; 5- Del Gaúcho; 6- Goes; 7- Treichel; 8- Terranueva.

### **2.2 Obtenção do Óleo essencial**

As folhas e flores secas do orégano foram submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira IV (1988), para obtenção do óleo. Após a extração, o óleo foi seco em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, grau p.a., concentrado sob N<sub>2</sub> ultra puro e armazenado em frascos âmbar, sendo mantido sob refrigeração até a utilização (Rodrigues, 2004). Os óleos essenciais obtidos foram denominados OE1 (Erechim); OE2 (Aves); OE3 (El Moncayo); OE4(La Rosa); OE5 (Del Gaúcho); OE6 (Góes); OE7 (Treichel) e OE8 (Terranueva).

### **2.3 Análise Cromatográfica**

O óleo essencial obtido foi analisado por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID-Schimadzu 17A), visando à identificação dos principais constituintes químicos. Foram preparadas soluções (5.000 µg mL<sup>-1</sup>) dos óleos essenciais, sendo injetados 1µL dessas soluções no cromatógrafo. Também foi preparada uma solução (40 µg mL<sup>-1</sup>) dos padrões cromatográficos ( $\alpha$ -pineno, canfeno,  $\beta$ -pineno, mirceno,  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineno, terpinoleno, linalol, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, timol e carvacrol), que foi submetida as mesmas condições das amostras. Os compostos nas amostras foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões terpênicos e com dados da literatura (Rodrigues et al., 2004).

### **2.4 Atividade antimicrobiana**

#### **2.4.1 Isolados de *Candida* spp.**

Doze isolados foram utilizados para os testes *in vitro* destes, nove eram de *C. albicans*, sendo cinco provenientes de mucosa e tegumento cutâneo de cães e quatro isolados padrões (ATCC 44858, 4053, 18804 e IOC 3691); os outros três eram isolados

padrões de espécies não-albicans, como *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. lusitanae* (ATCC 34449) e *C. krusei* (ATCC 34135).

Dos cinco isolados de *Candida* spp., quatro foram da mucosa vaginal de fêmeas caninas e um de caso clínico de candidíase cutânea, obtidos na cidade Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. As leveduras isoladas foram mantidas em subculturas no Ágar Sabouraud dextrose e estocadas a 5°C, no Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, UFPel.

Os isolados padrões foram gentilmente cedidos pela Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz INCQS), Rio de Janeiro, Brasil.

#### **2.4.2 Preparação dos inóculos**

Os inóculos das leveduras estudadas foram preparados a partir de colônias com 24h de crescimento em ágar sabouraud dextrose a 35°C. Uma alçada das colônias foram ressuspensas em tubos contendo solução salina estéril, homogeneizadas e ajustadas à escala 0,5 de MacFarland que corresponde a um inóculo inicial de aproximadamente  $1-5 \times 10^6$  cel mL<sup>-1</sup>. A suspensão de leveduras foi diluída em solução salina (1:50), homogeneizada, e submetida à diluição em meio RPMI 1640 (1:20), obtendo a concentração de  $1-5 \times 10^3$  cel mL<sup>-1</sup>.

#### **2.4.3 Teste de suscetibilidade de *Candida* spp. frente ao óleo essencial**

Os isolados de leveduras foram testados frente ao óleo essencial do *O. vulgare* utilizando-se o método de microdiluição em caldo, de acordo com o proposto pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS, M27-A2 (CLSI) com pequenas modificações. Após a preparação, um volume de 100µl dos inóculos foram distribuídos no sentido das linhas das microplacas.

A partir das soluções-estoque dos óleos essenciais do orégano, foram preparadas dez diluições sucessivas em meio RPMI com L-glutamina e tampão MOPS em pH 7,0, obtendo-se soluções com 1,0 a 0,001% do óleo. Adicionou-se 0,1% de Tween 80 ao meio RPMI como dispersante do óleo essencial, a fim de inibir a formação de micelas, favorecendo a diluição do orégano.

Alíquotas de 100 µL dessas diluições foram dispensadas seqüencialmente nas microplacas, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. Os testes foram realizados em duplicata, sendo a coluna 11 utilizada para o controle positivo (inóculo/meio) e a coluna 12 como controle negativo (óleo essencial/meio). As microplacas

foram incubadas a 35°C por 48h em agitação, e a interpretação dos resultados foi realizada através da visualização da turvação referente à multiplicação do microrganismo, comparada aos controles positivos e negativos. A susceptibilidade foi expressa pela concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento de *Candida* spp.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos da análise cromatográfica dos 8 óleos essenciais do *O. vulgare.*, onde observa-se as diferenças entre aos constituintes fenólicos nos oito óleos: Os óleos analisados apresentaram as seguintes concentrações em relação ao timol/carvacrol: OE1- 10,20/12,67; OE2 – 7,88/0,50; OE3 – 6,18/0,71; OE4 – 0,58/21,58; OE5 – 20,62/1,34; OE6 – 21,95/4,71; OE7 – 16,68/0,77; OE8 – 8,42/9,44.

Além desses compostos, nesta Tabela, também se pode observar outros constituintes importantes tais como: 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineno, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno e  $\alpha$ -terpineol. A Figura 1 apresenta um gráfico da variação da concentração (%) dos compostos *p*-cimeno, 4-terpineol, timol e carvacrol, nas diferentes amostras de óleo essencial do *O. vulgare* (orégano), onde se pode observar a grande variação da razão timol/carvacrol.

Esses dados estão de acordo com o descrito na literatura, sendo descrito que o óleo essencial de *Origanum vulgare* apresenta composição variável de compostos ativos, sendo que os fenóis como carvacrol, timol,  $\gamma$ -terpeno e *p*-cimeno podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo (Simões et al., 2003; Rodrigues et al., 2004; Bussata, et al., 2006). As altas concentrações destes compostos e sua relação são de grande importância para a eficácia do produto, porém estudos demonstram que a eficácia de compostos isolados, como timol e carvacrol, não alcançam a mesma eficiência do óleo essencial. Os precursores biossintéticos como  $\gamma$ -terpineno e *p*-cimeno, assim como 1,8-cineol, linalol,  $\alpha$ -terpineol exibiram atividade antimicrobiana, justificando a melhor eficiência do óleo total quando comparado a dos componentes isolados (Simões et al., 2003)

As diferenças observadas na composição química dos óleos essenciais analisados têm sido descrita na literatura, sendo que fatores geográficos como altitude e tipo de solo, época da colheita, condições climáticas, cultivo, condições de secagem e estocagem entre outras, influenciam na composição, qualidade e quantidade de óleo essencial presente nos vegetais

(Kokkini et al., 1994; Milos et al., 2000; Arango et al., 2004; Gobbo Neto & Lopes, 2006). Outro fator a ser considerado é que devido a ter sido utilizado material vegetal de origem comercial, poderia haver misturas de folhas, flores e caules de *O. vulgare* na amostra, assim como presença de orégano de diferentes origens ou diferentes espécies numa mesma amostra. Embora todos os órgãos de uma planta consigam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar de acordo com a parte da planta analisada e com a espécie estudada, já que o gênero *Origanum* apresenta 39 diferentes espécies (Simões et al., 2003).

Após o período de incubação as placas de microdiluição foram observadas, demonstrando através da técnica de microdiluição em caldo, sensibilidade dos isolados de *Candida* spp. frente ao óleo essencial do *O. vulgare* (Tabela 2). Diversos estudos têm demonstrado a potencialidade antimicrobiana dos óleos essenciais, utilizando diferentes técnicas adaptadas de antifungigrama, como difusão em ágar, difusão em disco e a técnica de diluição em caldo, sendo que o uso da técnica de microdiluição tem sido utilizado com bons resultados (Lambert et al., 2001; Arango et al., 2004; Baydarh et al., 2004; Busatta, 2006).

Em relação às CIMs houve homogeneidade dos valores entre os isolados analisados, diferente do que ocorre quando usam-se substâncias antifúngicas puras. Os resultados demonstraram diferenças de susceptibilidade entre os isolados de campo, isolados padrões e entre as diferentes espécies de *Candida*. Porém, observou-se que os isolados foram mais sensíveis aos óleos essenciais um e oito (OE1 e OE8), apresentaram menores valores de CIM quando comparado aos outros óleos (OE2, OE3, OE4, OE5, OE6, OE7).

Na análise cromatográfica das duas amostras (EO1 e EO8) de óleo essencial de orégano, que apresentaram melhores resultados *in vitro*, verificaram-se como componentes majoritários o 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, timol e carvacrol, chamando a atenção para o equilíbrio entre as concentrações de timol e carvacrol associado a grande concentração de 4-terpineol. Tem sido descrito que o composto 4-terpineol atua induzindo deformações na membrana celular, alterando conseqüente sua permeabilidade (Cox et al., 2000). Diversos autores acreditam que núcleos aromáticos, contendo um grupo funcional polar, sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana (Milos et al., 2000; Lambert et al., 2001; Porte & Godoy, 2001). É sugerido que a presença de um núcleo aromático e um grupo OH fenólico, formariam ligações de hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas



alvo. Ainda acredita-se que núcleos aromáticos, contendo um grupo funcional polar, sejam os responsáveis pela atividade antimicrobiana (Milos et al., 2000; Lambert et al., 2001; Porte & Godoy, 2001; Ultee et al., 2002).

Nas amostras analisadas no presente trabalho, além dos compostos fenólicos, estão presentes o 4-terpineol (maior quantidade que os compostos fenólicos) e o alfa-terpineol, álcoois terpênicos, também portadores da hidroxila (OH), polares e capazes de fazerem ligações de hidrogênio, o que justificaria os melhores resultados de CIM. Essas amostras apresentaram uma razão molar de 0,60 e 0,89, respectivamente, ou seja, concentrações muito próximas (OE1 - 10,20/12,67 e EO2 - 8,42/9,44).

O mecanismo de ação dos óleos essenciais é complexo e não está totalmente elucidado, entretanto alguns estudos sugerem uma alteração na atividade dos canais de cálcio, causando aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares vitais, assim como um decréscimo no ATP intracelular nas células enquanto que, simultaneamente há aumento no ATP extracelular, ocasionando uma ruptura na membrana celular do microrganismo (Sikkema et al., 1994; Sikkema et al., 1995; Ponce et al., 2003; Sartoratto et al., 2004). A ação antimicrobiana pode ser decorrente do prejuízo de diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas com a produção de energia e a síntese de componentes estruturais do microrganismo (Lambert et al., 2001).

Os maiores valores de CIM frente a *Candida* spp. apresentados pelos outros seis óleos (OE2 a EO7), podem ser justificados pela variação na razão molar dos compostos timol/carvacrol (15,76; 8,70; 0,03; 15,39; 4,66; 21,66 - respectivamente), mostrando sempre grande concentração de um em relação ao outro. Também a presença de compostos sem núcleos aromáticos e/ou sem hidroxilas, como  $\gamma$ -terpineno, *p*-cimeno e  $\alpha$ -terpineno, que são hidrocarbonetos monoterpênicos, encontrados em quantidade significativa naquelas amostras o que poderia justificar os valores encontrados para esses óleos essenciais (Nostro et al., 2004). A presença do composto *p*-cimeno, segundo alguns autores (59,60), exerce um efeito antagônico com o carvacrol e timol, o que explicaria a menor atividade antimicrobiana do óleo OE2 (20,38) OE4 (13,96) e OE6 (7,01).

Tendo em vistas estes resultados, conclui-se que as diferentes concentrações e proporções de compostos fenólicos influenciaram na CIM do óleo do *O. Vulgare* frente às leveduras estudadas. O equilíbrio das concentrações dos isômeros, timol e carvacrol parece

ter um efeito sinérgico e positivo na inibição do crescimento de diferentes espécies de *Candida*, porém todos os óleos analisados apresentaram atividade antifúngica nos testes *in vitro*.

#### 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arango, A.C.M.; Sánchez, J.G.B.; Galvis, L.A.B. Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimioterapy.*, v.17, p.325-331, 2004.
- Arcila -Lozano Cynthia Cristina, Guadalupe Loarca-Piña, Salvador Lecona-Urbe y Elvira González de Mejía El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *ALAN*, v.54, n.1, 2004.
- Baydarh, H.; Sagdiç, O.; Ozkan, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.*, v.15, p.169-172, 2004.
- Bussata, C., Mossi, A.J., Rodrigues, M.R.A., Cansian, R.L. and Oliveira, J.V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Braz J Microbiol.*, v.38, p.610-616, 2007.
- 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. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. *Rev. Vet. Zoot.*, v.2, p.14, 2007.
- Chami, N.; Chami, F.; Bennis, S.; Trouillas, J.; Remmal, A.. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *The Braz. J. Infec. Dis.*, v.8 (3), p.217-226, 2004.
- Cox, S.D.; Mann, C.M.; Markham, J.L.. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Applied Microb.*, v.88, p.170-175, 2000.
- Giordani, R.; Regli, P.; Kaloustian, J.; Mikai, C.; Abou, L.; Portugal, H. Antifungal effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytot. Res.*, 18:990-995, 2004.
- Porte, A.; Godoy, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. *B.CEPPA*, v.19, n.2, 2001.
- Gobbo-Neto, L.; Lopes, N.P.. Plantas medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Quim. Nova.*, v.30, n.2, p.374-381, 2006.

- Hsieh, P.C.; Mau, J.L.; Huang, S.H. Antimicrobial effect of various combinations of plant extracts. *Food Microbiology*, v.18, p.35-43, 2001.
- Kokkini, S.; Karousou, R.; Vokou, D.; Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Bioch System Ecol.* v.22, p.517-528, 1994.
- 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 Microb.*, v.91, p.453-462, 2001.
- Magill, S.S.; Shields C.; Sears, C.L.; Choti, M.; Merz, W.G. Triazole Cross-Resistance among *Candida* spp.: Case Report, Occurrence among Bloodstream Isolates, and Implications for Antifungal Therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 44:529–535, 2006.
- Milos, M.; Mastelic, J.; Jerkovic, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*). *Food Chem.*, v.71, p.79-83, 2000.
- Moretti, A.; Posteraro, B.; Boncio, L.; Mechelli, L.; Gasperis, E.; Agnetti, F.; Raspa, M. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnostic by PCR-REA. *Rev. Iber. Micol.*, v.21, p.39-142, 2004.
- Mueller, R.S.; Bettenay, S.V.; Shipstone, M.. Cutaneous Candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. *Vet. Rec.*, v.150, p.728-730, 2002.
- Nostro, A.; Blanco, A.R.; Cantelli, M.A.; Vincenzo, E.; Flamini, G.; Morelli, I., Roccaro, A.S.; Alonzo, V.. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. *FEMS Microb. Let.*, v.230, p.191-195, 2004.
- Ponce, A.G.; Fritz, R.; DelValle, C.; Roura, S.I. Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. *LWT.*, v.36, p.679-684, 2003.
- Rodrigues, M.R.A., Krause, L.C., Caramão, E.B., Santos, J.G., Dariva, C.; Oliveira, J.V. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.3042–3047, 2004.
- Raposo, J.B.; Nobre, M.O.; Fernandes, C.G.; Porto, M. Candidiase cutânea em um canino. *Rev Fac Zoot Vet Agron.*, v. 2/3, n.1, p.11-14, 1996.
- Rehder, V.L.G.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Sartoratto, A.; Figueira, G.M.; Duarte, M.C.T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. *Rev. Bras. Pl. Med.*, v.6, n.2, p.67-71, 2004.

- Santos Jr., I.D.; Souza, I.A.M.; Borges, R.G.; Souza, L.B.; Santana, W.J.; Coutinho, H.D.M. General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. *Scientia Medica.*, v.15, p.189-197, 2005.
- Sartoratto, A.; Machado, A.L.M.; Delarmelina, C.; Figueira, G.M., Duarte, M.C.T.; Rehder, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Bras. J. Microb.*, v.35, p.275-280, 2004.
- Sikkema, J.; Bont, J.A.M.; Poolman, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, v.269, p.8022-8028, 1994.
- Sikkema, J.; Bont, J.A.M.; Poolman, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, v.59, p.201-222, 1995.
- Simões, C.M.O.; Spitzer, V.. Óleos voláteis. In: *Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003, p.468-495.
- Simões, C.M.O.; E.P. Schenkel; G. Gosmann; J.C.P. Mello; L.A. Mentz; P.R. Petrovick. “*Farmacognosia: da planta ao medicamento*”. Ed. UFRGS: Porto Alegre, 2003, 1102p.
- Ultee, A., Bennink, M.H.J.; Moezelaar, R.. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, v.68, n.4, p.1561–1568, 2002.

Tabela 1 – Concentração (%) dos compostos presentes nos oito óleos essenciais do *O. vulgare* analisados por cromatografia gasosa (GC/FID).

*Amostras		1	2	3	4	5	6	7	8
Compostos		**C	**C	**C	**C	**C	**C	**C	**C
		(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
1	$\alpha$ -tujeno	0,63	2,15	0,71	0,63	0,90	0,12	0,31	0,25
2	$\alpha$ -pineno***	1,53	0,51	nd	0,10	nd	nd	nd	Nd
3	Sabineno	1,53	5,47	0,93	1,60	1,24	0,18	0,47	0,33
4	B-pineno***	0,19	0,27	nd	0,13	nd	nd	nd	Nd
5	mirreno***	1,22	1,71	0,12	0,70	0,28	0,20	0,30	0,18
6	$\alpha$ -felandreno	1,47	2,27	3,54	1,80	2,28	1,73	2,26	2,47
7	$\alpha$ -terpineno***	<b>3,46</b>	<b>7,00</b>	<b>4,64</b>	<b>4,27</b>	<b>5,60</b>	<b>2,43</b>	<b>2,83</b>	<b>2,83</b>
8	p-cimeno***	<b>15,90</b>	<b>20,38</b>	<b>1,85</b>	<b>13,96</b>	<b>1,84</b>	<b>1,13</b>	<b>7,01</b>	<b>0,71</b>
9	limoneno***	4,04	6,22	4,92	3,65	3,74	2,59	3,44	3,60
10	1,8-cineol***	2,75	0,09	nd	0,17	0,07	nd	0,07	0,53
11	cis/trans $\beta$ -ocimeno	0,56	0,62	0,04	0,43	0,26	0,13	0,24	0,08
12	$\gamma$ -terpineno***	<b>3,69</b>	<b>8,31</b>	<b>4,25</b>	<b>4,10</b>	<b>7,80</b>	<b>5,91</b>	<b>2,18</b>	<b>4,86</b>
13	trans sabineno hidratado	0,11	0,97	0,34	0,27	0,27	nd	0,13	0,07
14	terpinoleno***	1,61	3,41	1,89	2,10	2,78	1,63	1,29	1,69
15	cis sabineno hidratado	0,26	2,36	0,54	0,55	0,61	nd	0,26	0,08
16	linalol***	3,78	1,40	3,08	1,70	3,53	2,07	4,58	2,89
17	Trans- <i>p</i> -mentenol	0,17	0,28	0,33	0,26	0,14	0,10	0,25	0,12
18	Cis- <i>p</i> -mentenol	0,16	0,09	nd	0,10	nd	nd	nd	0,05
19	Borneol	0,40	0,23	0,13	0,10	0,26	0,36	0,34	0,27
20	4-terpineol***	<b>21,32</b>	<b>11,92</b>	<b>50,87</b>	<b>27,67</b>	<b>31,04</b>	<b>41,17</b>	<b>39,45</b>	<b>47,95</b>
21	$\alpha$ -terpineol***	<b>4,23</b>	<b>2,78</b>	<b>8,87</b>	<b>3,69</b>	<b>4,78</b>	<b>4,98</b>	<b>5,74</b>	<b>7,57</b>
22	trans-piperitol	0,15	0,10	0,30	0,26	0,08	0,17	0,11	0,35
23	cis-piperitol	0,10	0,06	nd	0,09	nd	nd	0,05	Nd
24	éter do metil timol	1,00	1,41	0,30	nd	1,03	0,58	1,73	0,10
25	éter do metil carvacrol	1,92	2,60	0,57	5,78	2,41	3,04	2,80	0,71
26	acetato de linalila	0,31	0,21	nd	0,42	nd	nd	0,26	Nd
27	geraniol/ nerol	1,35	5,30	0,68	0,29	2,21	0,51	1,25	0,70
28	timol***	<b>10,20</b>	<b>7,88</b>	<b>6,18</b>	<b>0,58</b>	<b>20,62</b>	<b>21,95</b>	<b>16,68</b>	<b>8,42</b>
29	carvacrol***	<b>12,67</b>	<b>0,50</b>	<b>0,71</b>	<b>21,58</b>	<b>1,34</b>	<b>4,71</b>	<b>0,77</b>	<b>9,44</b>
30	acetato de geranila/nerila	0,35	0,08	0,20	nd	0,51	0,21	0,47	0,20
31	B-cariofilleno	0,98	1,12	2,60	1,04	3,10	3,22	2,34	2,92
32	Germacreno	0,23	0,05	nd	0,64	nd	nd	0,07	Nd
33	Espatuleno	1,13	1,25	1,18	0,78	1,06	0,81	1,83	0,59
34	óxido de cariofileno	0,60	0,98	0,23	0,56	0,24	0,07	0,51	0,05

\* Amostras: 1- Erechim; 2- Aves; 3- El Moncayo; 4- La Rosa; 5- Del Gaúcho; 6- Goes; 7- Treichel; 8- Terranueva; \*\* C (%) = áreas dos picos normalizadas, sem usar fator de correção; \*\*\* Compostos identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões; Outros compostos identificados pelos dados da literatura (Rodrigues et al., 2002; Busatta et al., 2006); nd = não detectado.

**Tabela 2:** Valores referentes à Concentração Inibitória Mínima (CIM) de oito óleos essenciais *O. vulgare* frente à *Candida* spp.

ISOLADO	CIM O1	CIM O2	CIM O3	CIM O4	CIM O5	CIM O6	CIM O7	CIM O8
	( $\mu$ /mL)	( $\mu$ L/mL)	( $\mu$ L/mL)	( $\mu$ L/mL)	( $\mu$ L/mL)	( $\mu$ L/mL)	( $\mu$ L/mL)	( $\mu$ L/mL)
C 1	2,5	5	10	10	5	2,5	5	2,5
C 2	1,25	5	2,5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
C 3	2,5	2,5	10	5	2,5	5	2,5	2,5
C 4	2,5	10	5	10	5	5	5	1,25
C5	2,5	10	5	5	2,5	2,5	10	2,5
C 6	0,65	2,5	2,5	2,5	5,0	2,5	1,2	1,25
C 7	1,25	2,5	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
C 8	1,25	10	5	10	2,5	5	2,5	2,5
C 9	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
C 10	1,25	2,5	5	5	2,5	2,5	2,5	2,5
C 11	1,25	5	2,5	1,2	1,2	5	2,5	1,25
C 12	2,5	2,5	5	5	10	2,5	2,5	2,5

\*\*C1: *Candidíase* cutânea cão; C2: Mucosa canina; C3: Mucosa canina; C4: Mucosa canina; C5: Mucosa canina; C6: *C. albicans* ATCC 18804; C7: *C. albicans* ATCC 44858; C8: *C. albicans* ATCC 4053; C9: *C. albicans* IOC 3691; C10: *C.parapsilosis* ATCC 22019; C11: *C. lusitaniae* ATCC 34449; C12: *C.krusei* ATCC 34135. \*\*\*Amostras: O1- Erechim; O2- Aves; O3- El Moncayo; O4- La Rosa; O5- Del Gaúcho; O 6- Goes; O7- Treichel; O8- Terranueva.

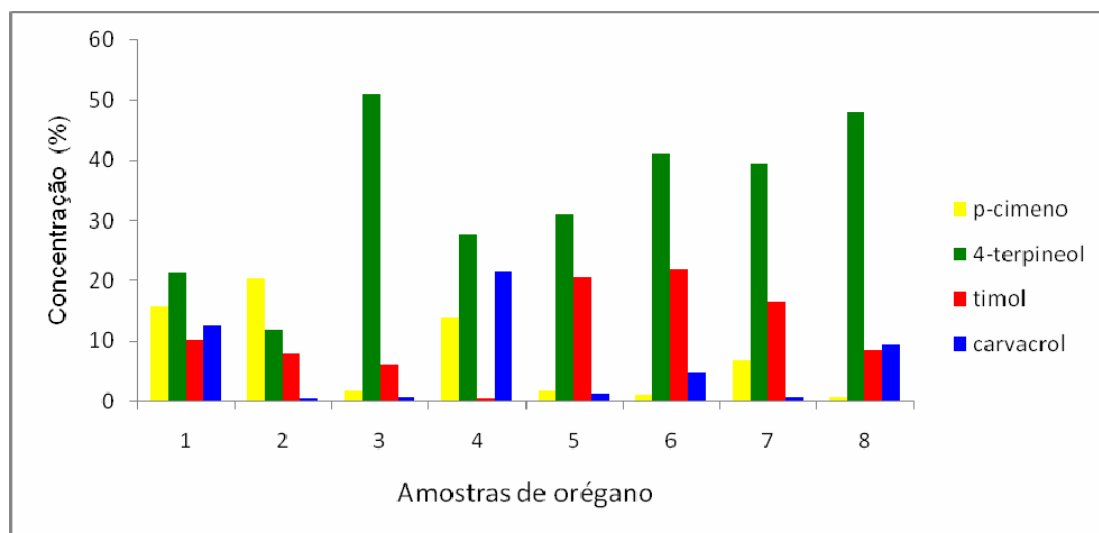


Figura 1 – Gráfico representativo da concentração (%) dos compostos *p*-cimeno, 4-terpineol, timol e carvacrol, nas diferentes amostras de óleo essencial do *O. vulgare* (orégano), analisados por cromatografia a gás (GC/FID). **Amostras:** 1- Erechim; 2- Aves; 3- El Moncayo; 4- La Rosa; 5- Del Gaúcho; 6- Goes; 7- Treichel; 8- Terranueva.

**ARTIGO IV**

**IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *ORIGANUM VULGARE* ESSENTIAL OIL  
AGAINST *CANDIDA* SPECIES.**

ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO  
BRAZILIAN JOURNAL OF MICROBIOLOGY  
SÃO PAULO - BRASIL



**IN VITRO SUSCEPTIBILITY OF *ORIGANUM VULGARE* ESSENTIAL OIL  
AGAINST *CANDIDA* SPECIES.**

CLEFF, M.B.<sup>1\*</sup>; MEINERZ, A.R.<sup>1</sup>; XAVIER, M.O.<sup>2</sup>; SCHUCH, L.F.<sup>2</sup>; MEIRELES,  
M.C.A.<sup>2</sup>; RODRIGUES, M.R.<sup>3</sup>; J.R.B. MELLO<sup>4</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, Faculdade Veterinária, UFRGS.

<sup>2</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade Veterinária, UFPel; <sup>3</sup>Departamento de Química Orgânica, UFPel; <sup>4</sup> Departamento Farmacologia,, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS.

**ABSTRACT**

This study had as objective to evaluate the action in vitro of the *O. vulgare* essential oil against the sixteen (16) isolates of *Candida* species. Different standards strains were used as: *C. albicans* (ATCC- 44858, 4053, 18804 and 3691), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 34135), *C. lusitaniae* (ATCC 34449) and *C. dubliniensis* (ATCC MY646), being seven isolated of *C. albicans* in the mucous of canines females and one mucous monkey. Microdilution in broth technique (CLSI) was used and inoculum fungal was adjusted in at 1 to  $5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. The essential oil was obtained by hydrodistillation in Clevenger, and analyzed for gaseous chromatography. The susceptibility against to the oil was express for the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC). All the isolates tested *in vitro* had been sensible to the *O. vulgare* essential oil. that Chromatography analysis presented as majority compounds 4-terpineol (46.6%), carvacrol (9.18%), tymol (8.06%) and  $\alpha$ -terpineol (7,35%). *Candida albicans* isolates from animals mucous presented values of MIC 2,72 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> and MFC 5 $\mu$ L mL<sup>-1</sup>. *Candida albicans* standarts presented values of MIC 2,97 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> and MFC 3,54 $\mu$ L mL<sup>-1</sup>, while that the species no-albicans showed MIC of 2,10 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> and MFC 2,97 $\mu$ L mL<sup>-1</sup>, (p $\leq$ 0,05). According these results *O. vulgare* essential oil can represent a good alternative for the treatment of candidiasis, because it was presented antifungal property against *Candida* spp in the tests *in vitro*.

---

Key Words: *Candida*, *Origanum vulgare*, essential oils, in vitro.

## SUSCETIBILIDADE IN VITRO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *ORIGANUM VULGARE* FRENTE A *CANDIDA* SPP.

### RESUMO

Neste estudo teve-se como objetivo avaliar a ação *in vitro* do óleo essencial do *O. vulgare* frente a dezesseis (16) isolados de *Candida* spp. Foram usados quatro isolados padrões de *C. albicans* (ATCC- 44858, 4053, 18804 e IOC -3691) e quatro não-albicans, sendo elas *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 34135), *C. lusitaniae* (ATCC 34449) e *C. dubliniensis* (ATCC MY646); além de sete isolados de *C. albicans* obtidas da mucosa de fêmeas caninas e um da mucosa de macaco prego. A técnica de microdiluição em caldo (CLSI) foi utilizada e o inóculo fúngico foi ajustado a uma concentração de  $5 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação em Clevenger, e analisado por cromatografia gasosa. A suscetibilidade frente ao óleo foi expressa pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Todos os isolados testados *in vitro* foram sensíveis ao óleo essencial do *O. vulgare*, que na análise cromatográfica apresentou como componentes majoritários o 4-terpineol (46.6%), carvacrol (9.18%), timol (8.06%) e  $\alpha$ -terpineol (7,35%). *Candida albicans* isolada da mucosa dos animais apresentou valores de MIC 2,72 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> e MFC 5 $\mu$ L mL<sup>-1</sup>. As cepas padrões de *Candida albicans* apresentaram valores de MIC 2,97 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> e MFC 3,54 $\mu$ L mL<sup>-1</sup>, enquanto que as espécies não-albicans tiveram MIC de 2,10 $\mu$ L mL<sup>-1</sup> e MFC 2,97 $\mu$ L mL<sup>-1</sup>, (p $\leq$ 0,05). De acordo com estes resultados, conclui-se que o óleo essencial do *O. vulgare* pode representar uma boa alternativa para o tratamento das candidíases, devido a apresentar propriedade antifúngica frente à *Candida* spp nos testes *in vitro*.

---

Palavras Chave: *Candida*, *Origanum vulgare*, óleo essencial, *in vitro*.

### INTRODUCTION

Candidiasis is one mycose decurrent of the infection of different species of *Candida*, which cause superficial and systemic infections, being described such as opportunist mycoses in the world (8, 13, 19, 20). Due the presence of domestic animals, candidiasis are more and more frequent the presence of patient geriatrics, immunosuppressed, and multiple dysfunction in the clinic, that they are susceptible to the fungal infections (8, 18, 20). The increasing clinical importance attributed for mycoses in veterinary medicine and the forms

of the illness lead for necessity of diagnostic different and treatments methods (11, 13, 18, 19).

The available antifungal currently for therapeutic of different clinical forms of the disease, many times present limitations that make difficult its use, it becomes necessary the search for products or molecules with antifungal action safe and efficient (3, 11, 15, 24, 25).

The research about substances obtained of vegetable represents a good perspective, especially in relation the plants of the Lamiaceae family as *the Origanum vulgare*, mainly its secondary metabolites that show antimicrobial activity (1, 2, 4, 5, 14, 22). Among the species of *Origanum*, their most important components are the monoterpenes phenolics compounds such as carvacrol and thymol, besides  $\rho$ -cimeno,  $\gamma$ -terpinoleno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, linalol, 4-terpinol, germacreno-D and  $\alpha$ -pineno, that are presents in small concentration (5, 9, 12, 21, 23, 29).

Oregano has a good antioxidant capacity and also presents antimicrobial activity against bacteria and fungi (1, 2, 5, 6, 9, 14, 17). A few studies have suggested a potential therapeutic effect against experimental infections in rats due to *Trichophyton rubrum* (1). The antifungal activity of the essential oil of the oregano against some species of *Aspergillus*, as *A. parasiticus*, *A. niger*, *A. flavus* and *A. ochraceus* was showed in other studies, as great in relation to the growth of the agent to the aflatoxin production (4, 10). Another study, the action of the oil has been tested against the isolates alives of medical interest of human patients as *Candida albicans* (7, 11, 16).

However, there is a few data available on the impact of essential oils on yeasts like *Candida* genus isolated of canines females with diagnostic of candidiasis and mucous of animals. The aim of this study is evaluate the inhibition capacity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species in order to facilitate their use as potential therapeutics.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Plant material**

Commercially available oregano samples (dried leaves from Chile) were purchased in market, with a botanical certification. The moisture content was determinate (9.7g/100g on a dry material basis) and the content of essential oil (EO) in raw material was found to be

1.282 mL of EO/100g of oregano (Torrenueva Vascos Ltda., M.M.Reg.S.B.N<sup>o</sup>.1082/08, Indústria Uruguaya tnueva@adinet.uy).

### **Essential oil**

Dried plant of *origanum* was subjected to hydrodistillation for 4 h using a modified Clevenger type apparatus, according to Brazilian Pharmacopeia IV (1988). After the extraction, the oil was dried in anhydrous sodium sulphate, filtered, concentrated under ultra pure N<sub>2</sub> and stored in amber flask at + 4°C (30).

### **Chemicals**

All chemicals (hexane, dichloromethane) were of analytical grade. Analytical standards, such as:  $\alpha$ -pinene,  $\beta$ -pinene, myrcene,  $\alpha$ -terpinene, p-cymene, limonene, 1,8-cineole,  $\gamma$ -terpinene, terpinolene, linalool, 4-terpineol,  $\alpha$ -terpineol, thymol and carvacrol were supplied from Sigma. RPMI Media 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY,USA), Tween 80 (Sigma), Sabouraud dextrose agar (Oxoid, Basingstoke, UK), McFarland standard (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), and buffer 3-morpholinopropanesulfonic acid (MOPS) and phosphate-buffered saline (PBS) (Sigma).

### **Chromatography analysis**

*Origanum* essential oil was submitted to chromatography analysis in a gas chromatograph with a flame ionization detector (GC/FID, model Shimadzu 17A). Chromatography analysis was carried out in an chromatograph equipped with a DB-5 silica capillary column (methyl siloxane with 5% phenyl groups - 30 m x 0.25 mm  $\phi$ , film thickness 0.25  $\mu$ m). Nitrogen was used as the carrier gas with a flow 1.0 mL min<sup>-1</sup> and split ratio was 1:50. Injector and detector temperatures were both set at 280°C. Column temperature was programmed to 40°C, gradually increased to 145°C at 2°C min<sup>-1</sup> and then increased to 280°C at 10°C min<sup>-1</sup>, which was held for 10 min. It was prepared an oil solution for 5000  $\mu$ g L<sup>-1</sup> in hexane and 0.5  $\mu$ L from this solution was injected into the system. Essential oil was examined in triplicate. Analytical standards solution was prepared for 100  $\mu$ g L<sup>-1</sup> in hexane and submitted to same conditions of the oil.

## **ANTIMICROBIAL ACTIVITY**

### **Isolates of *Candida* species**

The seven isolates of *Candida albicans* were from the vaginal mucous membrane of females canine and one isolates of cutaneous tegument of monkey (*Cebus apella*) in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. They were stored into the Mycology Laboratory, Veterinary Faculty/Federal University of Pelotas (UFPel). Standards strains were: *C. albicans* (ATCC- 44858, 4053, 18804 and 3691), *C. parapsilosis* (ATCC 22019), *C. krusei* (ATCC 34135), *C. lusitaniae* (ATCC 34449) and *C. dubliniensis* (ATCC MY646), supplied by Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz/Rio de Janeiro/Brazil).

### **Preparation of the inoculate**

Yeast inoculum was prepared by growing isolates of *Candida* on SDA for 24 h at 35°C and then suspending in 5 mL of sterile physiological saline solution and homogenized. The inoculum suspension had its turbidity adjusted by according to the 0.5 McFarland standard what corresponds an initial inoculum with approximately  $5 \times 10^6$  CFU mL<sup>-1</sup>. Then, was prepared dilution 1:50 in sterile physiological saline solution, and another dilution 1:20 in RPMI Media 1640 were prepared in 96-well microtitre trays (Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA). The adjusted inoculum suspension (100 µL) was dispensed in each well, resulting in the desired final drug concentration and inoculum size between 1 and  $5 \times 10^3$  CFU mL<sup>-1</sup>. The plates were incubated at 35°C for 48 h.

### **Antifungal susceptibility testing**

The isolated yeasts were tested by broth microdilution method, performed according to the proposed to National Committee for Clinical Laboratory Standards NCCLS, M27-A2 (CLSI) standard guidelines, with minor modifications. It was used a solution 1% Tween 80 as RPMI Media dispersant of the essential oil, avoiding the micellas formation, favoring the dilution.

### **Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeast**

Using stocks solution of essential oil of origanum, it was prepared ten successive dilutions in RPMI Media with L-glutamine without bicarbonate and buffered with MOPS at pH 7.0. For yeasts, minimum inhibitory concentrations (MICs) were determined by subculturing 100 µL of those concentrations from each well (1 to 10) of the microtitre tray. Positive control (inoculum/media) and negative control (essential oil/media) were included

into wells 11 and 12. Trays were incubating aerobically at 35°C until 48 h with shaking. Susceptibility was expressed as minimum inhibitory concentration (MIC), defining as the lowest concentration required to arrest the growth of the fungi by 24 h of incubation in relation to the positive control. To determine the minimum fungicidal concentrations (MFC) values, 10 µL of broth was removed from each well and agar sabouraud dextrose plates and incubated further for the appearance of yeast-like growth.

### STATISTICAL ANALYSIS

MIC and MFC between the different isolates of *Candida* were compared through the analysis of variance and the comparison between geometric averages according to Tukey test, using the statistical package Statistix 6.0, considering significance  $p \leq 0,05$ .

### RESULTS AND DISCUSSION

In this study the susceptibility of various yeasts to a range of essential oils *O. vulgare* was determined, the MICs and MFC, respectively a broth microdilution method was used. Isolated of *C. albicans* from mucous of the animals presented sensible in the concentrations of MIC  $2.72 \mu\text{L mL}^{-1}$  and MFC of  $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ ; standards inhibited in an oil concentration that varied  $2.97 \mu\text{L mL}^{-1}$  of CIM and MFC  $3.54 \mu\text{L mL}^{-1}$ . Isolates no-*albicans* had MIC medium of  $2.10 \mu\text{L mL}^{-1}$  and MFC average of medium  $2.97 \mu\text{L mL}^{-1}$  (Table 1).

The results demonstrated different susceptibility between the isolates ones of field and standards, as well as between different *candida* species, without statistical significance (Fig. 1). Research had been reported the values of CIM more raised for *C. albicans* against antifungal traditional (24) demonstrating the occurrence of resistance with the use of antifungal of the azoles group (15, 24, 25). These results present clinical importance since *C. albicans* is responsible for the great majority of the infections in patients with candidiasis recurrent, being the main isolate species in the cases of candidiasis mucocutaneous in small animals (8, 13, 19), considered as high pathogenicity species (7, 11, 24). Recent papers confirm no-*albicans* species in clinical cases in humans and animals (18, 20), being known the intrinsic resistance of the *Candida krusei* to the azoles derivatives (15, 24).

Authors had described the occurrence of clinical resistance and CIM values more raised against antifungals for different non-albicans species including *C. lusitanae* e *C. glabrata* (24, 25). Aligiannis *et al.* (2) evaluating CIM of the essential oil of two species of *Origanum* established values between 0.28 to 1.27 mg mL<sup>-1</sup> for bacteria, and 0.65-1.27 mg mL<sup>-1</sup> for fungi, similar values found in this present work (7, 16).

Chromatographic analysis of oregano essential oil presented as component majority 4-terpineol,  $\gamma$ -terpineno, thymol and carvacrol, being that the monoterpenes phenolics showed in raising concentrations when compared with the other constituent of the oil (Table 2, Fig. 2). Some monoterpenes and sesquiterpenes can have been responsible for the susceptibility of the isolates tested front to this essential oil, since the antifungal activity of this oil has been attributed to thymol, carvacrol and eugenol (6, 7, 14, 29).

According to some studies, the composition, quality and amount of present essential oil in vegetables can have great variations, being influenced by diverse factors as the geographic and climatic conditions, planting, drying and storage (3, 9, 12, 17).

The way as the microorganisms are inhibited by essential oils seems to include different mechanisms of action (2, 14, 26, 27, 28). Toxic effects on membrane structure and function have been generally used to explain the antimicrobial action of essential oils and their monoterpenoid compounds (12, 26, 27) Studies suggest that the antimicrobial action can be current of the enzyme damage diverse, including that involved with the production of energy and synthesis of structural components of the microorganism, besides the destruction or inactivation of genetic material (14, 28). The phenolic compounds of oils should cause disturbance of membrane-embedded proteins, inhibition of respiration, and alteration of ion transport processes of the cellular membrane and modify the activity of the calcium canals, causing increase of the permeability and release of the vital intracellular constituent (28).

## CONCLUSIONS

By view point of results, it is possible to conclude that the essential oil of the *O. vulgare* can come to represent a good alternative for the treatment of candidiasis presented antifungal action *in vitro* against the *Candida* spp.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Foundation Coordination of Perfectioning of Staff of Nível Superior (CAPES), National Advice of Scientific and Technological Development (CNPq), Foundation of Support to the Research of the Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Pos-Graduation Program in Veterinary Sciences of the Federal University of Rio Grande do Sul - UFRGS.

## BIBLIOGRAPHICAL REFERENCES

1. Adam, K.; Sivropoulou, A.; Kokkini, S.; Lanaras, T.; Arsenakis, M. (1998). Antifungal activities of *Origanum vulgare* subsp. *Hirusutum*, *Menthab spicata*, *Lavanula angustifolia* and *salvia fruticosa* essential oils against human pathogenic fungi. *J. Agricul Food Chem.*, 46, 1739-1745.
2. Aligiannis, N.; Kalpoutzakis, E.; Mitaku, S.; Chinou, I.B. (2001). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.*, 49, 4168-4170.
3. Arango, A.C.M.; Sánchez, J.G.B.; Galvis, L.A.B. (2004). Productos naturales con actividad antimicótica. *Rev. Esp. Quimiot.*, 17, 325-331.
4. Basilico, M.Z.; Basilico, J.C. (1999). Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. *Lett. Appl. Microbiol.*, 29, 238-241.
5. Baydarh, A.; Sagdiç, O.; Zkan, G. (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.*, 15, 169-172.
6. Busatta, C.; Mossi, A.J.; Rodrigues, M.R.A.; Cansian, R.L.; Oliveira, J.V. (2007). Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. *Braz. J. Microbiol.*, 38, 610-616.
7. Chami, N.; Chami, F.; Bennis, S.; Trouillas, J.; Remmal, A. (2004). Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *The Braz. J. Infec. Dis.*, 8 (3), 217-226.



8. 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.* 14 (2), 164-168.
9. Dorman, H.J.D.; Surai, P.; Deans, S.G. (2000). *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. *J. Essenc. Oil Res.*, 12, 241-248.
10. Farag, R.S.; Daw, Z.Y.; Abo-Raya, S.H. (1989). Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. *J. Food Science*, 54, 74-76.
11. Giordani, R.; Regli, P.; Kaloustian, J.; Mikai, C.; Abou, L.; Portugal, H. (2004). Antifungal effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytot. Res.*, 18, 990-995.
12. Kokkini, S.; Karousou, R.; Vokou, D. (1994). Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Bioch System Ecol.*, 22, 517-528.
13. Lacaz, C.S.; Porto, E.; Martins, J.E.C.; Vaccari, E.M.; Melo, N.T. (2002). *Tratado de Micologia Médica*. 9ed., Sarvier, São Paulo, SP.
14. Lambert, R.J.W.; Skandamis, P.N.; Coote, P.J. (2001). A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microb.*, 91, 453-462.
15. Magill, S.S.; Shields C.; Sears, C.L.; Choti, M.; Merz, W.G. (2006). Triazole Cross-Resistance among *Candida* spp.: Case Report, Occurrence among Bloodstream Isolates, and Implications for Antifungal Therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 44, 529–535.
16. Manohar, V; Ingram, C.; Gray, J.; Talpur, N.A.; Bagghi, D.; Preuss, H.G. (2001). Antifungal activities of *Origanum* oil against *Candida albicans*. *Molec. Cel. Bioch.*, 228, 111-117.
17. Milos, M.; Mastelic, J.; Jerkovic, I. (2000). Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. spp. hirtum). *Food Chem.*, 71, 79-83.

18. Moretti, A.; Boncio, L.; Posteraro, B.; Mechelli, L.; Balducci, M. (2006). Co-cutaneous infection in a dog: pcr-reverse identification of *C. tropicalis* on skin biopsy. *J. Mycol. Med.*, 16, 30-36.
19. Moretti, A.; Posteraro, B.; Boncio, L.; Mechelli, L.; Gasperis, E.; Agnetti, F.; Raspa, M. (2004). Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnostic by PCR-REA. *Rev. Iber. Micol.*, 21, 139-142.
20. Mueller, R.S.; Bettenay, S.V.; Shipstone, M. (2002). Cutaneous Candidiasis in a dog caused by *Candida guilliermondii*. *Vet. Rec.*, 150, 728-730.
21. Rhyu, H.Y. (1979). Gas chromatographic characterization of oregano and other selected spices of the labiate family. *J. Food Sc.*, 44, 1373-1378.
22. Rodrigues, M.R.A., Caramão, E.B., Santos, J.G. Dariva, C.; Oliveira, J.V. (2003). The effects of temperature and pressure on the characteristics of the extracts from high-pressure CO<sub>2</sub> extraction of *Majorana hortensis* Moench. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 453–456.
23. Rodrigues, M.R.A., Krause, L.C., Caramão, E.B., Santos, J.G., Dariva, C.; Oliveira, J.V. (2004). Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO<sub>2</sub>. *J. Agric. Food Chem.*, 52, 3042–3047.
24. Sanglard, D.; Odds, F.C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet. Infect. Dis.*, 2, 73-85.
25. Santos Jr., I.D.; Souza, I.A.M.; Borges, R.G.; Souza, L.B.; Santana, W.J.; Coutinho, H.D.M. (2005). General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. *Scientia Medica*. 15, 189-197.
26. Sikkema, J.; Bont, J.A.M.; Poolman, B. (1994). Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *J. Biol. Chem.*, 269, 8022-8028.
27. Sikkema, J.; Bont, J.A.M.; Poolman, B. (1995). Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, 59, 201-222.
28. Trombetta, D.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Venuti, V.; Cristani, M.; Daniele, C.; Saija, A.; Mazzanti, G.; Bisignano, G. (2005). Mechanisms of Antibacterial action of three monoterpenes. *Antim. Agents and Chemoth.*, 49, 2474-2478.
29. Wagner, K.H.; Elmadfa, I. (2003). Biological relevance of terpenoids. Overview focusing on mono- di- and tetraterpenes. *Ann. Nutr. Metabol.*, 47, 95-106.

Table 1: Results of Minimum Inhibitory Concentration (CIM) and Minimum Fungicidal Concentration (CFM) for *Origanum vulgare* essential oil on the growth of *Candida* spp.

ISOLATES	CIM	CIM	CFM	CFM
	(%)	( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )	(%)	( $\mu\text{L mL}^{-1}$ )
<i>C. albicans</i> (mucous dog 1)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (mucous dog 2)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (mucous dog 3)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (mucous dog 4)	0.5 – 1	5	1	10
<i>C. albicans</i> (mucous dog 5)	0.5 – 1	5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (mucous dog 6)	0.12-1	1.2	0.25 – 1	2.5
<i>C. albicans</i> (Cutaneou dog)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (Cutaneou monkey)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (ATCC 44858)	0.25 – 1	2.5	0.25 – 1	2.5
<i>C. albicans</i> (ATCC 4053)	0.5 – 1	5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (IOC 3691)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5
<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	0.25 – 1	2.5	0.25 – 1	2.5
<i>C. dubliniensis</i> (MY 646)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	0.25 – 1	2.5	0.25 – 1	2.5
<i>C. lusitaniae</i> (ATCC 34449)	0.12 – 1	1.2	0.12 – 1	1.2
<i>C. krusei</i> (ATCC 34135)	0.25 – 1	2.5	0.5 – 1	5

\*\*CIM = minimum inhibitory concentration; CFM= minimum fungicidal concentration

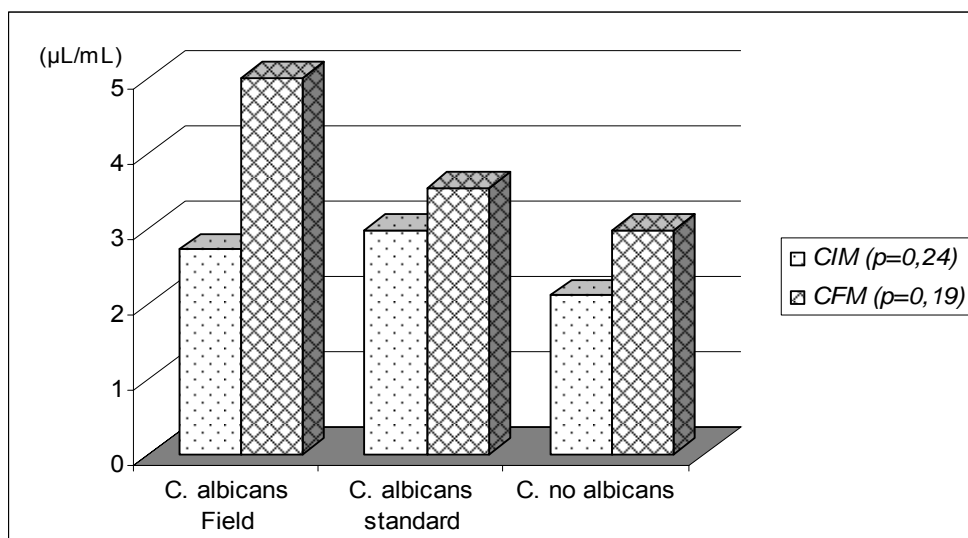


Figure 1. Results of minimum inhibitory concentration (CIM) and minimum fungicidal concentration (CFM) for *Origanum vulgare* essential oil on the growth of isolated of *C. albicans* from mucous of the animals, standards *Candida* spp and isolates no-albicans.

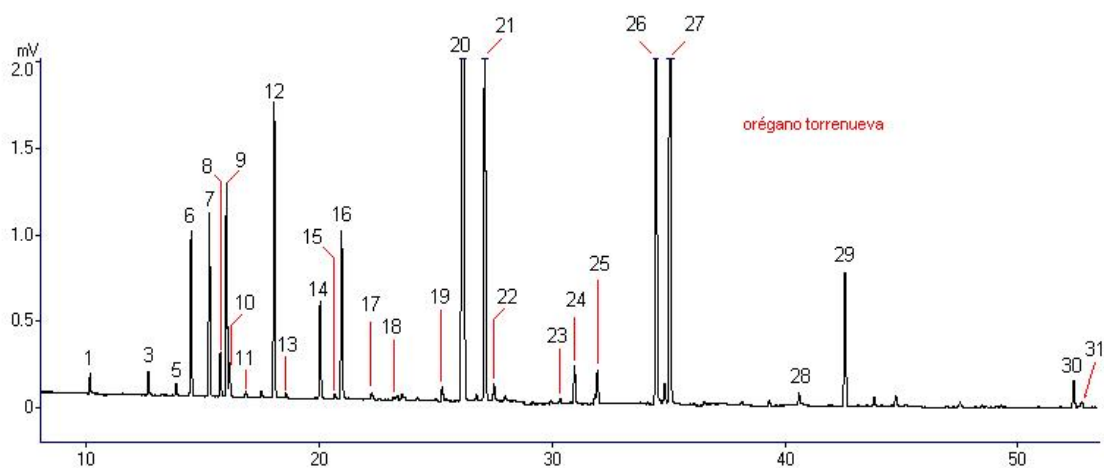


Figure 2. Chromatogram of oregano essential oil obtained by hydrodistillation in Clevenger, essential oil where one can see that terpineneol (peak 20),  $\alpha$ -terpineol (peak 21) and are the major components, followed by thymol (peak 26) and carvacrol (peak 27). Peaks identification in table 2.

Table 2. Principals compounds identified in *Origanum vulgare* essential oil, using chromatography analysis in a gas chromatograph with a flame ionization detector (GC/FID, model Shimadzu 17A).

Peak	Retention time (min)	Compounds	FM	C** (%)
1	10.05	$\alpha$ -thujene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.25
2	10.36	$\alpha$ -pinene*	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Nd
3	12.56	Sabinene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.33
4	12.68	$\beta$ -pinene*	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	Nd
5	13.75	myrcene*	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.18
6	14.40	$\alpha$ -phellandrene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	2.47
7	15.19	$\alpha$ -terpinene*	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	2.83
8	15.67	p-cimene*	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub>	0.71
9	15.94	Limonene*	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	3.60
10	16.06	1.8-cineole*	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.53
11	16.75	cis/trans $\beta$ -ocimene	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	0.08
12	17.97	$\gamma$ -terpinene*	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	4.86
13	18.49	trans-sabinene hydrate	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.07
14	19.96	terpinolene*	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	1.69
15	20.58	cis-sabinene hydrate	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.08
16	20.87	Linalol*	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	2.89
17	22.18	trans- <i>p</i> -menthenol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.12
18	23.11	cis- <i>p</i> -menthenol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.05
19	25.20	Borneol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.27
20	26.09	4-terpineol*	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	47.95
21	27.03	$\alpha$ -terpineol*	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	7.57
22	27.43	trans-piperitol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.35
23	30.27	methyl thymol éter	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	0.10
24	30.89	methyl carvacrol éter	C <sub>11</sub> H <sub>16</sub> O	0.71
25	31.88	geraniol/ nerol	C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> O	0.70
26	34.41	Thymol*	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	8.42
27	35.00	Carvacrol*	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O	9.44
28	40.54	geraniol/neril acetate	C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> O <sub>2</sub>	0.20
29	42.53	$\beta$ -caryophyllene	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	2.92
30	52.37	Spathulenol	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0.59
31	52.67	caryophyllene oxide	C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> O	0.05

**ARTIGO V**

**Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum  
Vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar**

ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO  
LATIN AMERICAN JOURNAL OF PHARMACY  
La Plata - Argentina

**Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum Vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar**

Marlete B. CLEFF<sup>1\*</sup>; Ana R. MEINERZ<sup>1</sup>; Elisa S. SALLIS<sup>2</sup>; Tatiane A. ANTUNES<sup>2</sup>,  
Antonella MATTEI<sup>2</sup>, Maria R. RODRIGUES<sup>2</sup>; Mário C.A. MEIRELES<sup>2</sup>; João R.B.  
MELLO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Xavier Ferreira 618, Pelotas 96010-540 RS, Brasil; [emebrum@bol.com.br](mailto:emebrum@bol.com.br);  
<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Pelotas, 96010-900, RS, Brasil.

**RESUMO.** Nas últimas décadas a propriedade inibitória dos óleos essenciais vegetais frente à *Candida* spp. tem sido estudada, estando a do orégano entre eles. Todavia, são escassos os trabalhos sobre a toxicidade do referido óleo. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade do óleo essencial do *O. vulgare* administrado em ratas Wistar, adultas. Quatro grupos experimentais foram constituídos, grupo I (óleo por via oral, n=10); grupo II (controle oral, n=5), grupo III, (óleo por via intra-vaginal, n=10) e grupo IV (controle intra-vaginal, n=5). O tratamento diário foi realizado por 30 dias. Utilizou-se emulsão a 3% vol/vol do óleo essencial de *O. Vulgare* que apresentava os seguintes constituintes: g-terpineno (4.86%), 4-terpineol (47.95%),  $\alpha$ -terpineol (7.56%), timol (8.42%) e carvacrol (9.43%). Ao final do tratamento, os animais foram eutanasiados, sendo realizadas necropsias. Os resultados não evidenciaram qualquer alteração macroscópica nos tecidos do trato reprodutivo e digestório, assim como em fígado, baço e rins. Nas avaliações clínicas, hematológicas e histopatológicas não foram observadas alterações. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o óleo essencial do *O. vulgare* não causa alterações toxicológicas relevantes, quando administrado à 3% por via oral e intra-vaginal em ratas Wistar, por 30 dias. Outros estudos são necessários, incluindo um período maior de administração e, utilizando óleos com diferentes proporções de terpenos, além da avaliação da toxicidade reprodutiva.

**PALAVRAS-CHAVE:** Óleo essencial, *Origanum vulgare*, ratos Wistar, toxicidade.

**SUMMARY.** “Pre-clinic toxicity of the repeate-dose of *Origanum Vulgare* L. (Origanum) essential Oil in Wistar Rats”. In recent decades the inhibitory property of the essential oils against *Candida* spp. has been studied, and antimicrobial activities of origanum has been evaluated. However, the papers evaluating the toxicity of this oil are scarce. The objective of this work was to evaluate the toxicity of the *Origanum vulgare* essential oil administered orally and intravaginal in adult female Wistar rats. This study was accomplished with 4 groups of female rats, group I (oil administration orally, n=10); group II (control orally, n=5), group III, (oil administration intravaginal, n=10) and group IV (control intravaginal, n=5). The treatment for 30 days, everyday. The essential oil was used 3% (v/v) in emulsion, and concentration of main compounds were:  $\gamma$ -terpinene (4.86%), 4-terpineol (47.95%),  $\alpha$ -terpineol (7.56%), thymol (8.42%) and carvacrol (9.43%). After the experimental period, necropsy of the animals was accomplished, and macroscopic alterations were not observed

in the tissues of the reproductive and digestive systems, as well as in liver, spleen and kidneys. The clinical, hematological and histo-pathological evaluation didn't demonstrate any alteration. According to the results, the *O. vulgare* essential oil 3%, when administered orally and intravaginal, during 30 days in Wistar rats, is not responsible for toxicological alterations. Other studies using *O. vulgare* oils with different terpenes concentrations are necessary. Reproductive toxicity investigations are also necessary.

**KEY WORDS:** Essential oils, *Origanum vulgare*, wistar rats, toxicity.

## INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas tem tido um aumento na incidência e fatalidade nas últimas décadas, sendo descritos casos de infecção em humanos e animais, especialmente em imunocomprometidos, devidos principalmente ao gênero *Candida*<sup>1,2,3</sup>. Estas leveduras são integrantes da microbiota oral, gastrointestinal e reprodutiva de mamíferos, sendo consideradas patógenos oportunistas<sup>1-4</sup>. Fatores que alterem o equilíbrio parasita-hospedeiro favorecem a instalação da micose podendo ocorrer quadros clínicos leves, graves ou fatais<sup>2,4-6</sup>. Estudos demonstram que as infecções por *Candida*, são um fenômeno crescente a nível mundial, representando um problema de saúde pública, devido em parte, a sobrevida de pacientes transplantados e neutropênicos, do uso indiscriminado de fármacos como antibióticos e corticosteróides e das doenças imunodepressoras<sup>2,4-7</sup>. Aliado aos crescentes casos da micose tem ocorrido resistência por parte de algumas espécies de levedura frente aos antifúngicos usuais, e relatos de recidivas da enfermidade aumentando assim, a necessidade de pesquisas de novas substâncias com atividade antifúngica<sup>2,8</sup>.

Devido a demonstrarem atividade frente a diversas espécies de fungos, os óleos essenciais têm despertado interesse, especialmente os óleos de plantas aromáticas como *Origanum vulgare*<sup>9-12</sup>. A atividade antimicrobiana do *O. vulgare*, tem sido atribuída aos compostos fenólicos que encontram-se como componentes majoritários no seu óleo essencial, sendo que os principais são os monoterpenos e sesquiterpenos, como gama-terpineno, alfa-terpineno,  $\rho$ -cimeno, carvacrol e timol<sup>11,13-16</sup>.

Entretanto, apesar de se observar um aumento no consumo de produtos naturais, com base no argumento de que plantas são totalmente seguras, as supostas propriedades farmacológicas muitas vezes não têm validade científica, por não terem sido investigadas quanto a esta ação em testes in vitro ou in vivo<sup>17</sup>. Devido a serem produtos de extração de uma espécie vegetal, os óleos essenciais são mais concentrados, apresentando toxicidade mais elevada que a planta de origem<sup>18</sup>, sendo necessário a realização de estudos



toxicológicos como suporte de segurança para uso destes produtos<sup>17,18</sup> assim o objetivo deste trabalho foi de avaliar a toxicidade do óleo essencial do *O. vulgare* administrado em doses repetidas em ratas Wistar.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### ***Animais experimentais***

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar, fêmeas, adultas, com peso variando de 240 a 250 g., provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (BC-UFPeL). O experimento foi desenvolvido na sala de experimentação do BC-UFPeL, onde os animais foram acomodados em caixas, mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro, recebendo água *ad libitum* e dieta de acordo com peso corporal.

Antes da administração do extrato, todos os animais foram adaptados ao manuseio e a sondagem pelo período de duas semanas. Todos os procedimentos respeitaram os princípios da ética em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### ***Grupos Experimentais***

O estudo foi realizado com 30 animais que foram divididos em quatro grupos experimentais: **Grupo I:** Dez ratas foram tratadas com 0,5 mL de óleo por via oral, uma vez ao dia, durante 30 dias.

**Grupo II:** Cinco ratas utilizadas como controle oral, tratadas com 0,5 mL do veículo (Suspensão 0,001% de Tween 80) .

**Grupo III:** Dez ratas foram tratadas com 0,5 mL de óleo por via intra-vaginal, uma vez ao dia, durante 30 dias

**Grupo IV:** Cinco ratas utilizadas como controle intra-vaginal, tratadas com 0,5 mL do veículo (Suspensão de ágar 0,8%).

### ***Dose de Ensaio, Preparo e Administração***

A dose utilizada no estudo foi definida a partir dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos nos testes *in vitro* frente a isolados de *Candida*, onde foi estabelecida uma CIM média de 0,3% para o óleo essencial do *O. vulgare*, sendo este valor multiplicado por dez.

Nos grupos experimentais I e III, 0,5mL do óleo essencial foi utilizado na concentração de 3% vol/vol, sendo que para a via oral foi utilizada emulsão contendo 0,001% de Tween 80<sup>19</sup> e para a via intravaginal o óleo foi disperso em suspensão de ágar a 0,8%<sup>9</sup>. No grupo II, foi administrado 0,5 mL de solução contendo 0,001% Tween 80<sup>19</sup>, e para grupo IV 0,5 mL de suspensão de ágar a 0,8%<sup>9</sup>.

Para administração oral foi utilizada sonda flexível nº.6, e para a via intravaginal utilizou-se como aplicador uma sonda flexível adaptada a seringa graduada de 1 mL.

#### ***Obtenção do óleo essencial de *O. vulgare****

A amostra de orégano utilizada no estudo foi adquirida em distribuidor comercial (Torrenueva Vascos Ltda., I.M.M.Reg.S.B.Nº.1082/08, Indústria Uruguaya) que forneceu o produto com certificado de qualidade, de origem e identificação botânica. Cerca de 40g de folhas secas de orégano foram submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira<sup>20</sup>, para obtenção do óleo. Após a extração, o óleo foi seco em Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, grau p.a., concentrado sob N<sub>2</sub> ultra puro e armazenado em frascos âmbar, mantido sob refrigeração até a utilização<sup>14</sup>.

#### ***Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama (GC/FID)***

O óleo essencial obtido foi analisado por GC/FID, sendo caracterizado em função dos principais constituintes químicos. Para tal 1µL de soluções de concentrações variadas de padrões foram injetadas no cromatógrafo e, comparados com o tempo de retenção de padrões referentes aos principais compostos presentes em amostras de orégano<sup>14</sup>.

#### ***Acompanhamento clínico***

Os animais pertencentes aos quatro grupos experimentais foram avaliados clinicamente durante os 30 dias, de acordo com o critério clínico descrito na literatura<sup>21</sup>, sendo feitas observações quanto ao estado geral de cada animal, constatação de modificação da deambulação, piloereção, ocorrência de diarreia e de mortes, além de pesagens semanais de todas as ratas. Para os animais dos grupos I e II, ainda foram observados alterações comportamentais, como agressividade, consciência e disposição, assim como feitas avaliações do sistema locomotor como presença/ausência de incoordenação e perda de equilíbrio. Nos animais dos grupos II e IV foram feitas avaliações visíveis da cavidade vaginal, sendo observados presença/ausência vermelhidão, descamação e lesão local.

### ***Avaliação hematológica***

No final do período experimental foi coletado sangue através de punção-cardíaca, para a realização do hemograma completo. Os exames laboratoriais foram realizados no setor de Patologia Clínica da Faculdade de Veterinária - UFPEl<sup>27, 28</sup>. Após a coleta de sangue os animais foram sacrificados através de anestesia profunda e necropsiados.

### ***Análise histopatológica***

Ao final dos 30 dias foi realizada eutanásia dos animais experimentais com tiopental sódico via intraperitoneal na dose de 50mg/Kg. Durante as necropsias dos animais dos grupos I e II, foram feitas análises macroscópicas e colhidas amostras de tecido da mucosa oral e de órgãos internos como estômago, intestino, baço, rins, fígado. Nas ratas pertencentes aos grupos III e IV, após avaliação macroscópica foi coletado o trato reprodutivo e órgãos internos como rins, baço e fígado. Os órgãos colhidos para o exame histopatológico foram acondicionados em formol a 10%, sendo, posteriormente, incluídos em parafina e processados, utilizando-se coloração de HE (Hematoxilina-Eosina) e PAS (Ácido Periódico-Schiff), para posterior análise histológica.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise cromatográfica do óleo essencial utilizado no estudo demonstrou como principais componentes químicos os terpenos: 4-terpineol,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, timol e carvacrol (Tabela 1). Embora todos os órgãos de uma planta consigam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar de acordo com a parte da planta analisada e com a espécie estudada<sup>17</sup>. Fatores como tipo de solo, altitude, temperatura, período de insolação, cultivo, condições de secagem e estocagem entre outros, influenciam na composição, qualidade e quantidade de óleo essencial presente nos vegetais<sup>13,14,22,23</sup>. Em nosso estudo foram utilizadas as folhas e flores secas e desidratadas de *O. vulgare*, sendo que os resultados na análise cromatográfica foram condizentes aos dados da literatura, onde descrevem como componentes químicos majoritários os compostos  $p$ -cimeno, terpinoleno,  $\rho$ -cimeno, terpinoleno,  $\gamma$ -terpineno,  $\alpha$ -terpineol, linalol, 4-terpineol, timol, carvacrol e germacreno-D e  $\alpha$ -pineno, dentre outros<sup>10,11,14,22</sup>.

Durante o período de observação de 30 dias, nenhum dos animais experimentais (grupos I, II, III, IV) apresentou alterações clínicas, comportamentais, de deambulação ou

morte, ao receberem o óleo essencial do *O. vulgare* a 3%, ou respectivos controles, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos. Em relação a massa corporal, observou-se um ganho de peso semanal dos animais conforme o esperado para a espécie estudada (Tabela 2).

A ausência de efeitos colaterais pelo o uso do *Origanum vulgare* foi demonstrada em outros estudos com animais domésticos<sup>9,24,25</sup>. A adição de folhas secas da planta na dieta de suínos resultou em maior índice reprodutivo em leitoas, além de melhorar a atividade metabólica intestinal desses animais, e quando adicionou 1000ppm do óleo essencial de *O. vulgare* na dieta, não foram observadas quaisquer alterações<sup>24</sup>. Segundo os autores os efeitos positivos do vegetal na saúde e produção de suínos podem ser devido à ação antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória<sup>24</sup>, sendo que a propriedade anti-radical atribuída ao *O. vulgare* se deve a presença dos monofenóis, carvacrol e timol<sup>11</sup>. Outros autores ao adicionar o óleo essencial do *O. vulgare* (300mg/kg) á ração de aves poedeiras constataram uma diminuição na contaminação por hemoparasitas<sup>25</sup>. Estudos da ação de compostos isolados são escassos, entretanto a avaliação de eugenol e carvacrol em ratos demonstrou que as substâncias não causaram efeitos colaterais ou tóxicos<sup>9,16</sup>.

Em relação à análise hematológica, o estudo demonstrou que o uso do óleo essencial na concentração de 3% por via tópica ou oral, assim como seus respectivos controles, não provocou alteração no hemograma, eritrograma (hematócrito, hemoglobina e contagem de hemácia) e leucograma (leucócitos, neutrófilos e linfócitos), resultando em níveis fisiológicos para a espécie estudada<sup>26,27</sup> (Tabela 4). O hemograma constitui o meio mais direto e prático de se estudar os elementos figurados do sangue periférico<sup>26,27</sup>. Estes elementos celulares sofrem alterações no decurso de, praticamente, todas as enfermidades<sup>27,28</sup>. Efetivamente, estas alterações são inespecíficas, comuns a um grande número de patologias, porém os achados hematológicos fornecem informações diagnósticas valiosas sobre o sistema hematológico e outros sistemas orgânicos, prognóstico, resposta ao tratamento e recuperação<sup>28</sup>. A maioria dos distúrbios hematológicos podem ser identificados por anormalidades específicas desses resultados, sendo que na identificação de estados patológicos o sangue muitas vezes pode fornecer informações diagnósticas valiosas<sup>26-28</sup>.

No estudo anatomopatológico dos órgãos e tecidos coletados durante a necrópsia,

também não foram evidenciadas alterações macroscópicas ou morfológicas, assim como em relação ao estudo histopatológico das amostras coletadas dos animais experimentais, sem diferença entre os grupos.

Segundo estudos os testes de toxicidade prolongada envolvem a avaliação patológica grosseira, nesta etapa deve-se pesar os órgãos vitais, que serve como índice útil da toxicidade<sup>29</sup>. Os pesos dos órgãos estão listados na tabela 3. Os resultados demonstraram que a administração deste quimiotipo de *O. vulgare* e dos controles, pelo período de 30 dias, na concentração e modelo animal utilizados, não causou alteração na massa dos órgãos analisados.

Alguns autores têm descrito que o grau da toxicidade de um extrato depende de vários fatores, entre eles da dose utilizada e da frequência de administração, em alguns casos baixas dosagens acarretam intoxicações devido à sensibilidade individual, provocando desde sensibilização, alergias, até problemas mais graves, principalmente quando utilizados por via oral<sup>16,17</sup>. Os monoterpenos com diferentes grupos funcionais tais como, hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas são inibidores *in vitro* das monoxigenases CYP2B1, e podem alterar a biotransformação de substâncias tóxicas<sup>11,30</sup>. Por outro lado, estudos clínicos têm demonstrado que *Orégano* spp apresenta alergenicidade, sendo recomendado evitar o consumo excessivo durante a gravidez devido a propriedades sedativas e abortivas<sup>11</sup>. Estudo utilizando extrato aquoso a 20% de *O. vulgare* em fêmeas prenhes, evidenciaram pequeno atraso no desenvolvimento embrionário, porém o percentual de embriões anormais não foi significativo, o que foi atribuído ao efeito antimutagênico e antioxidante do extrato<sup>31</sup>. O potencial anticarcinogênico parece ser devido a capacidade do óleo de *O. vulgare* induzir um incremento na atividade da enzima detoxificante glutathione S-transferase (GST) quando administrado oralmente<sup>32</sup>.

Os efeitos adversos do uso de extratos vegetais, possível toxicidade, bem como a ação sinérgica ou antagônica com outros fármacos podem ocorrer comumente, devido a estes e outros fatores, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos a vários aspectos, dentre eles quanto ao seu efeito tóxico sobre organismos animais<sup>17,18</sup>. *Origanum vulgare* demonstra ter aplicações benéficas na produção de alimentos e na saúde do homem, com custo relativamente baixo devido a uso de pequenas concentrações, sendo considerando um promissor agente antimicrobiano<sup>10,24,25</sup>.

O óleo essencial do *O. vulgare* quando administrado à 3% por via oral e intra-vaginal em ratas Wistar pelo período de 30 dias, não causou efeitos tóxicos, levando em conta a ausência de alteração na massa de órgãos, da massa corporal e da ausência de alterações de hemograma. São necessários outros estudos utilizando outros óleos com diferentes proporções de terpenos, seus principais componentes químicos, além de um período maior de administração aos animais experimentais, assim como avaliação da toxicidade reprodutiva.

**Agradecimentos.** CAPES; CNPq; FAPERGS e PROPESC/UFRGS.

#### **REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Lacaz, C.S., E. Porto, J.E.C. Martins, E.M. Vaccari & N.T. Melo (2002) “*Tratado de Micologia Médica*”. Sarvier. São Paulo.
2. Colombo, A.L. & T. Guimarães (2003) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**: 599–607.
3. Crocco, E.I., L.M.J. Mimica, L.H. Muramuta, C. Garcia, V.M. Souza, L.R.B. Ruiz & C. Zaitz (2004) *An Bras. Dermatol.* **79**: 689-97.
4. Cleff, M.B., A.P. Lima, R.O. Faria, A.R.M. Meinerz, T.A. Antunes, F.B. Araújo, P.S. Nascente, M.O. Nobre & M.C.A. Meireles (2005) *Braz. J. Microbiol.* **32**: 201-4.
5. Moretti, A., B. Posteraro, L. Boncio, L. Mechelli, E. Gasperis, F. Agnetti & M. Raspa (2004) *Rev. Iber. Micol.* **21**: 139-42.
6. Moretti, A., L. Boncio, B. Posteraro, L. Mechelli & M. Balducci (2006) *J. Mycol. Med.* **16**: 30-36.
7. Rodriguez, M.C., C. Sotomayor, M.E. Costamagna, B.S. Renteria, A.M. Masini & S. Correa (2003) *Am. J. Phys. Cell.* **284**:111-8.
8. Sanglard, D. & F.C. Odds (2002) *Lancet Infect Dis.* **2**: 73-85.
9. Chami, N.; F. Chami & S. Bennis (2004) *Braz. J. Infect. Dis.* **3**:217-26.
10. Busatta, C. (2006) “*Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona*”. Ed.URI Erechim, RS.
11. Arcila-Lozano, C.C., L.P. Guadalupe, L.U. Salvador & E.G. Mejía (2004) *Arch. Latinam. Nutric.* **54**: 1-24.
12. Viegas, E.C., A. Soares, M.G.F. Carmo & C.A. Rosseto (2005) *Hortic. Bras.* **23**: 915-9.

13. Milos, M.; J. Mastelic & I. Lerkivic (2000) *Food Chem.* **71**:79-83.
14. Houmani, Z.(2002) *J Herbs, Spice & Med Plants* **9**: 1049-55.
15. Rodrigues, M.R.A.(2002) “*Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano*”. Ed. UFRGS. Porto Alegre.
16. Vincenzi, M., A. Stammati, A. Vincenzi & M. Silano (2004) *Fitoter.* **75**: 801-04.
17. Veiga Junior, V.F., A.C. Pinto & M.A.M. Maciel (2005) *Quim. Nova* **28**: 519-28.
18. Simões, C.M.O., E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (2003) “*Farmacognosia: da planta ao medicamento*”. Ed. UFRGS. Porto Alegre.
19. Mondello, F., F.D. Bernadis, A. Girolamo, A. Cassone & G. Salvatore (2006) *BMC Infect. Dis.* **6**:158.
20. “*Farmacopéia Brasileira*” (1988) Atheneu. São Paulo.
21. Manson, J.M. & Y.J. Kang (1994) “*Principles and methods of toxicology*” Raven Press. New York, p.989-1034.
22. Rehder, V.L.G., A.L.M. Machado, C. Delarmelina, A. Sartoratto, G.M. Figueira & M.C.T. Duarte (2004) *Rev. Bras. Pl. Med.* **2**: 67-71.
23. Gobbo-Neto, L. & N.P. Lopes (2006) *Quim. Nova* **30**: 374-381.
24. Allan, P. & G. Bilkey (2005) *Theriogen.* **63**: 716-721.
25. Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, F. Christaki, N.A. Botsoglou & A.B. Spais (2003) *Arch. An. Nut.* **57**: 99-106.
26. Sanderson, J.H. & C.E. Philips (1981) “*An Atlas of Laboratory Animal Haematology*”. Clarendo Press, Oxford.
27. Duncan, J.R. & K.W. Prasse (1982) “*Patologia Clínica Veterinária*”, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
28. Guimarães, R.X. (1990) “*Clínica e Laboratório: Interpretação Clínica das provas laboratoriais*” Sarvier. São Paulo.
29. Valcarenghi, D.A. (2006) “*Avaliação Toxicológica Crônica do polímero Quitosana Ferro (III) Solúvel*”. Ed.Universidade do Vale de Itajaí, SC.
30. De-Oliveira, A., L.F. Ribeiro-Pinto & F.J.R. Paumgarten. (1999) *Tox Lett.* **92**: 39-46.
31. Benavides, V., G. Trujillo, G. D'Arrigo, U. Paredes & J. Pino (2000) *Rev. Peru. Biol.* **7**:
32. Lam, L.K.T. & B. Zheng (1991) *J. Agric. Food Chem.* **39**: 660-662.

Tabela 1: Principais compostos e respectivas concentrações de terpenos encontrados no óleo essencial do *O. vulgare* analisado por cromatografia gasosa.

<b>PADRÃO</b>	<b>Tempo retenção</b>	<b>PM</b>	<b>Área</b>	<b>Concentração</b>
1. $\alpha$ -tujeno	10.054	114	353	0.2533
2. Sabineno	12.566	133	456	0.3270
3. Mirceno	13.754	66	250	0.1791
4. $\alpha$ -phellandrene	14.399	943	3451	2.4736
5. $\gamma$ -terpineno	15.181	1050	3944	2.8272
6. p-cimeno	15.663	255	993	0.7119
7. Limoneno	15.928	1228	5026	3.6026
8. 1,8-cineol	16.061	189	735	0.5270
9. cis-trans $\beta$ cimene	16.758	29	113	0.0810
10. $\gamma$ -terpineno	17.974	1693	6780	<b>4.8600</b>
11. trans-sabinene-hidrate	18.489	24	96	0.0690
12. terpinolene	19.952	559	2364	1.6947
13. cis-sabinene-hidrate	20.582	26	107	0.0764
14. Linalol	20.873	963	4028	2.8872
15. trans-p-menthenol	22.180	40	173	0.1241
16. cis-p-menthenol	23.121	14	74	0.0528
17. borneol	25.203	83	379	0.2719
18. 4-terpineol	26.136	12183	66900	<b>47.9525</b>
19. $\alpha$ -terpineol	27.042	2294	10555	<b>7.5656</b>
20. trans-piperitol	27.433	99	482	0.3455
21. methyl-tymol-éter	30.280	30	135	0.0969
22. methyl-carvacrol-éter	30.894	215	990	0.7094
23. geraniol nerol	31.887	191	976	0.6997
24. Timol	34.418	2523	11750	<b>8.4221</b>
25. Carvacrol	35.002	2807	13165	<b>9.4363</b>
26. geraniol/neril acetato	40.557	64	281	0.2016
27. $\beta$ -caryophyllene	42.537	783	4068	2.9156
28. spathulenol	52.373	155	823	0.5899
29. caryophyleno oxide	52.745	16	65	0.0462

PM: Peso Molecular dos compostos analisados.



Tabela 2: Média da massa corporal dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, vaginal e respectivos controles, aferidas semanalmente pelo período de cinco semanas.

<b>Grupos Experimentais</b>	<b>Massa inicial (g)</b>	<b>2ª. Pesagem</b>	<b>3ª. Pesagem</b>	<b>4ª. Pesagem</b>	<b>Massa Final (g)</b>
<b>G I (n=10)</b>	238,7	242	247,8	254	261,2
<b>GII (n=5)</b>	237	241	248,2	253	260,3
<b>G III (n=10)</b>	240,7	245,9	252	258	264,5
<b>GIV (n=5)</b>	242,2	247	253,1	257,8	263,8

**GI:** *O. vulgare* via oral; **GII:** Suspensão 0,001% Tween 80 ; **GIII:** *O.vulgare* intravaginal; **GIV:** Suspensão de Ágar 0,8%.

Tabela 3: Média da massa dos órgãos dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, vaginal e respectivos controles, aferidas ao final do experimento.

<b>Órgão</b>	<b>G I</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
Cérebro	2,07	2,0	1,96	2,05
Coração	1,02	1,10	1,05	1,15
Baço	0,87	0,90	0,84	0,86
Fígado	9,9	10,4	10,1	10,3
Pulmão	1,79	1,84	1,78	1,82
Rim	1,38	1,43	1,40	1,44

**GI:** *O. vulgare* via oral; **GII:** Suspensão 0,001% Tween 80; **GIII:** *O.vulgare* intravaginal; **GIV:** Suspensão de Ágar 0,8%.

Tabela 4: Valores médios referentes ao hemograma dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, vaginal e respectivos controles, aferidas ao final do experimento.

<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>G I</b>	<b>GII</b>	<b>GIII</b>	<b>GIV</b>
Basófilos (mm <sup>3</sup> )	0	0	0	0
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> )	29	0	70	0
Monócitos (mm <sup>3</sup> )	0	0	0	0
Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	3035	3168	4362	3528
Bastonetes (mm <sup>3</sup> )	0	0	0	0
Segmentados (mm <sup>3</sup> )	1636	1632	1268	672
Leucócitos Totais (mm <sup>3</sup> )	4700	4800	5700	4200
ERITRÓCITOS (x 10 <sup>6</sup> µL)	6,8	7,2	7,1	7,4
HEMOGLOBINA (g/dL)	10,7	11,3	11	11,6
HEMATÓCRITO (%)	34	36	35	37
PPT (%)	7,4	6,9	6,6	7,5

**GI:** *O. vulgare* via oral; **GII:** Suspensão 0,001% Tween 80; **GIII:** *O. vulgare* ntravaginal; **GIV:** Suspensão de Ágar 0,8%.

**ARTIGO VI**

**AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *ORIGANUM VULGARE* NO  
TRATAMENTO DA CANDIDÍASE EXPERIMENTAL SISTÊMICA**

## AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *ORIGANUM VULGARE* NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE EXPERIMENTAL SISTÊMICA

CLEFF, M.B.<sup>1</sup>.; MARTIS, A.A.<sup>1</sup>.; MADRID, I.<sup>2</sup>.; SANTIN, R.<sup>2</sup>.; FARIA, R.O.<sup>1</sup>.;  
SCHUCH, L.F.<sup>3</sup>.; RODRIGUES, M.R.<sup>4</sup>.; J.R.B., MELLO<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, UFRGS;emebrum@bol.com.br;  
<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, UFPel;  
<sup>3</sup>Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel; <sup>4</sup>Departamento de Química Orgânica, UFPel.

### RESUMO

A candidíase é uma das micoses mais freqüentes em humanos imunodeprimidos, sendo que em medicina veterinária é crescente sua importância ocorrendo vários relatos da enfermidade em animais. O tratamento com fluconazol resulta normalmente, em uma boa resposta terapêutica, porém há resistência intrínseca por parte de algumas espécies de *Candida*, análises *in vitro* ressaltam boa atividade antifúngica do *O. vulgare* frente a essas leveduras. Assim, o objetivo do estudo foi avaliar ação do óleo essencial do *O. vulgare* no tratamento da candidíase experimental sistêmica. Para isso foram utilizados 48 ratos wistar, distribuídos em quatro grupos: T1/n=12:Óleo 1,5%; T2/n=12:Óleo 3%; T3/n=12: Fluconazol 10mg/Kg; T4/n=12: Controle (emulsão); os óleos foram emulsionados com 0,001% de Tween 80. A reprodução experimental foi realizada com isolado canino, ao qual foi preparada suspensão com células de *C. albicans* (10<sup>6</sup> céls/mL), e inoculada pela veia lateral da cauda. Os fármacos e o diluente foram administrados diariamente por via oral durante 30 dias, com auxílio de sonda orogástrica. Os animais foram pesados, analisados quanto a parâmetros clínicos, retro isolamento do agente, alterações macroscópicas e pesagem dos órgãos. Os sinais da micose iniciaram nas primeiras 48-72hs de experimento. Em todos os parâmetros clínicos avaliados (perda de peso, apatia, sangramento nasal, andar em círculo, lateralidade da cabeça, incoordenação e órbitas), os grupos tratados T1, T2, T3 foram melhores que controle negativo (T4) (p<0,05). Observaram-se diferenças entre os pesos dos animais, sendo o grupo T3 o mais pesado e o grupo T1 o mais leve. Não houve diferenças entre os grupos para as alterações macroscópicas nos órgãos, com exceção dos rins, onde o grupo T3 diferiu em relação aos demais grupos (T1,T2,T4). Quanto ao retroisolamento o grupo T4 foi aquele em que se observou maior retroisolamento em todos os órgãos e o grupo T3 foi o que apresentou menor. Conclui-se que o óleo essencial do *Origanum vulgare* apresenta atividade antifúngica, demonstrando bons resultados no tratamento da candidíase experimental sistêmica, porém são necessários maiores estudos que possibilitem introduzir esta substância como opção terapêutica para candidíase.

**Palavras-Chave:** Candidíase, sistêmica, ratos, *Origanum vulgare*.

## ABSTRACT

*Candidiasis is one of mycosis more frequent in immunosuppressed human, being that in veterinary medicine its importance is occurring increasing some stories of the disease in animals. The treatment with fluconazole results normally, in a good therapeutical reply, however it has resistance on the part of some candida species, analyses in vitro stand out good antifungal activity of the *O. vulgare* front to these yeasts. Thus, the objective of the study was to evaluate action of the essential oil of the *O. vulgare* in the treatment of candidiasis experimental systemic. For this 48 wistar rats had been used, distributed in four groups: T1/n=12:Oil 1,5%; T2/n=12:Oil 3%; T3/n=12: Fluconazole 10mg/Kg; T4/n=12: Control (emulsion); the oils had been emulsified with 0,001% of Tween 80. The experimental reproduction was carried through with isolated tooth, to which was prepared suspension with cells of *C. albicans* ( $10^6$  céls/mL), and inoculated by via the lateral tail vein. The drugs and diluents had been managed daily by saw oral during 30 days, with assist of or gastric sounding lead. The animals had been weighed, analyzed how much the clinical parameters, backward isolation of the agent, macroscopic alterations and weighing of the agencies. The signals of mycosis had initiated in first 48-72hs of experiment. In all the clinical parameters evaluated (loss of weight, apathy, nasal bleed, to walk in circle, incline of the head, incordenation and deaths), treat groups T1, T2, T3 had been better that it has controlled negative (T4) ( $p < 0,05$ ). One observed differences between the weights of the animals, being group T3 heaviest and the lightest group T1. It did not have differences between the groups for the macroscopic alterations in the agencies, with exception of the kidneys, where group T3 differed in relation to the too much groups (T1, T2, T4). How much to the retroisolation the T4 group was that one where if it observed greater retroisolation in all the agencies and group T3 was what it presented minor. It is concluded that the essential oil of the *Origanum vulgare* presents antifungal activity, demonstrating to good results in the treatment of candidiasis experimental systemic, however they are necessary greater studies that they make possible to introduce this substance as therapeutical option for candidiasis.*

**KEY-WORDS:** Candidiasis, systemic, rats, *Origanum vulgare*.

## INTRODUÇÃO

A candidíase ocorre devido à multiplicação e invasão de *Candida* spp. nos tecidos, podendo causar lesões superficiais em pele e mucosas, assim como disseminação para diferentes órgãos como rins, pulmão, coração, articulações, ossos e sistema nervoso central (Lacaz et al., 2003). As formas clínicas mais severas da enfermidade têm sido associadas com pacientes imunocomprometidos, neutropênicos e transplantados (Sant'ana et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2003).

Em clínica médica humana *Candida* spp vem sendo amplamente reconhecida como o patógeno oportunista de maior ocorrência (Colombo & Guimarães, 2003; Sant'ana et al., 2002), e apontada como principal agente de micoses em imunodeprimidos em todo o mundo (Herwaldt & Pfaller, 2002; Lacaz et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2003). A

transformação da levedura, de comensal a importante agente de infecções, ocorre comumente em ambiente hospitalar, como resultado do próprio progresso da medicina (Diekema et al., 2002; Santos Jr. et al., 2005).

Em medicina veterinária a multiplicação celular das leveduras é facilitada por alguns fatores como: produção excessiva de cerume no caso de otites, alterações do pH, após terapia antibiótica ou com glicocorticóides, com fármacos indutores de neutropenia, deficiência nutricional, principalmente de vitaminas e ferro, doenças metabólicas, endocrinopatias, confinamento, assim como deficiência na resposta imune mediada por células, podem ser importantes no desencadeamento da infecção (Guillot et al., 1996; Lacaz et al.; 2002; Mueller et al., 2002), sendo crescentes os casos citados na literatura (Moretti et al., 2004; Moretti et al., 2006; Cleff et al., 2007).

O fluconazol é um dos fármacos mais utilizado para tratamento das infecções sistêmicas por *Candida*, no entanto, seu uso é restrito nos casos de infecções por *C. Krusei*, *C. glabrata*, devido à resistência frente ao antifúngico (Silva et al., 2002; Santos Jr., et al., 2005; Castro et al., 2006).

Estudos têm avaliado, a atividade antifúngica do óleo essencial do *Origanum vulgare* frente a espécies de *Candida*, demonstrando inibição da levedura em testes *in vitro* e *in vivo* (Lambert et al., 2001; Manohar et al., 2001; Chami et al., 2004; Giordani et al., 2004), assim como forte ação frente a diversos fungos causadores de micoses oportunistas (Daferera et al., 2000; Lambert et al., 2001). Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o óleo essencial do *O. vulgare* no tratamento da candidíase experimental sistêmica.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção do óleo essencial do *O. vulgare***

A amostra de orégano utilizada no estudo foi adquirida em distribuidor comercial (Torrenueva Vascos Ltda., I.M.M.Reg.S.B.Nº.1082/08, Indústria Uruguaya) que forneceu o produto com certificado de qualidade, de origem e identificação botânica. Cerca de 40g de folhas secas de orégano foram submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira, para obtenção do óleo.

O óleo essencial obtido foi analisado por GC/FID, sendo caracterizado em função dos principais constituintes químicos. Para tal 1µL de soluções de concentrações variadas de

padrões foram injetadas no cromatógrafo e, comparados com o tempo de retenção de padrões referentes aos principais compostos presentes em amostras de orégano.

### **Animais experimentais**

Para a realização do estudo *in vivo* foram utilizados 48 ratos norvergicus (*Rattus rattus*), albinos linhagem Wistar, com oito semanas de idade, machos com peso médio de 300g. Os animais foram alojados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), sendo mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro recebendo dieta de acordo com peso corporal água “ad libitum” durante o período experimental.

Todos os animais foram adaptados ao manuseio e a sondagem pelo período de duas semanas, os procedimentos respeitaram os princípios da ética em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **Grupos experimentais**

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais, de acordo com o tratamento recebido:

**T1 (n=12):** Tratados com 0,5 mL de emulsão de óleo a 1,5% em solução contendo 0,001% de Tween 80.

**T2 (n=12):** Tratados com 0,5 mL de emulsão de óleo a 3% em solução contendo 0,001% de Tween 80.

**T3 (n=12):** Tratados com 0,5 mL de solução de Fluconazol (10mk/Kg).

**T4 (n=12):** Tratados com o veículo (Suspensão contendo 0,001% de Tween 80).

### **Isolados de *Candida albicans* utilizado no estudo**

Todos os animais experimentais foram inoculados com isolado de *Candida albicans* proveniente de caso clínico de Candidíase cutânea em cão, estocado na micoteca do Laboratório de Micologia, Faculdade de Veterinária, UFPel.

### **Preparo do inóculo fúngico**

O inóculo fúngico foi preparado utilizando colônias de *C. albicans* cultivadas a 35°C por um período de 24-48hs. As colônias foram retiradas do meio de cultura com auxílio de uma alça de platina, adicionadas a solução salina tamponada (PBS) homogeneizadas e padronizadas em  $10^6$  células de *C. albicans*/mL.

### **Inoculação experimental**

A suspensão de células fúngicas foi inoculada em volume de 0,1 mL pela veia lateral da cauda em todos os animais experimentais, sendo todos foram anestesiados previamente.

### **Candidíase Experimental Sistêmica**

A candidíase experimental sistêmica foi desenvolvida de acordo com Yamaguchi (1987). Uma semana antes da inoculação, e durante todas as semanas do experimento, os animais receberam acetato de hidrocortizona 100 mg/Kg, a cada 7 dias via subcutânea. Para controle das infecções bacterianas secundárias foi adicionado 0,5mg/mL hidrocloridrato de tetraciclina na água de beber dos animais.

### **Tratamento dos animais experimentais**

Um dia (24hs) após os animais experimentais serem inoculados com *C. albicans*, foi iniciado o tratamento dos grupos experimentais, uma vez ao dia, por um período de 30 dias. A administração dos fármacos, assim como dos diluentes nas doses preestabelecidas, foi realizada em todos os animais pela via oral com o auxílio de uma sonda orogástrica.

O óleo essencial utilizado para o tratamento foi extraído previamente e apresentava a seguinte composição química: alfa-felandreno, alfa-terpineno, limoneno, linalol, gamma-terpineno, 4-terpineol, alfa-terpineol, timol, carvacrol e beta-cariofileno.

### **Acompanhamento clínico dos animais experimentais com Candidíase sistêmica**

Durante o período experimental, os animais foram avaliados duas vezes por semana, a fim de observar alterações físicas e/ou comportamentais, sendo essas descritas em relatórios semanais nos quais foram registradas as alterações. Foram feitas observações quanto ao estado geral de cada animal, constatação de modificação da deambulação, piloereção, alterações de comportamento, como agressividade, consciência e disposição, assim como feitas avaliações do sistema locomotor como presença/ausência de incoordenação e perda de equilíbrio e ocorrência de mortes, além de pesagens semanais de todos os ratos.

### **Necropsia dos animais experimentais**

No final do período experimental de 30 dias, os animais foram sacrificados através de anestesia profunda e necropsiados. Foram feitas análises macroscópicas de tecido da mucosa oral e de órgãos internos como estômago, intestino, baço, rins, fígado, pulmão, coração e cérebro, sendo todos os órgãos pesados. Os mesmos procedimentos descritos foram



realizados com os animais que morreram durante o período experimental. Fragmentos de rins, fígado, baço, pulmão, sistema digestório e cérebro foram coletados e conservados em formol a 10% e enviados ao Departamento de Patologia Animal.

#### **Retroisolamento de *Candida albicans***

Após a pesagem, os rins, fígado, baço, pulmão e cérebro dos animais, foram semeados em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e acondicionados à 35°C por 24-hs para obtenção do retroisolamento do agente.

#### **ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A comparação entre os tratamentos, da frequência de sinais clínicos observados e alterações macroscópicas, assim como a frequência de óbito durante todo o experimento, foram analisadas através do programa Epi Info 6.0, utilizando o teste de qui-quadrado, segundo Mantel-Henzel, com grau de significância de 95%. A análise comparativa de um escore clínico composto pela presença (valor atribuído 2) ou ausência (valor atribuído 1) dos sinais clínicos: apatia, sangramento nasal, andar em círculo, lateralidade cabeça e perda de equilíbrio, foi realizado através do método para dados não-paramétricos de Kruskal-Wallis, utilizando o pacote estatístico Statistix 8.0. Ainda, ao retro-isolamento no final do experimento foi atribuído um escore ordinal de acordo com a quantidade subjetiva de microrganismo recuperado por grama de tecido (1- negativo; 2- pouco; 3- intermediário; 4- muito), a partir dos 4 órgãos analisados (baço, cérebro, fígado e rim) e do sangue e analisados individualmente pelo método não paramétrico de Kruskal-Wallis.

#### **RESULTADOS**

##### **Avaliação clínica dos animais experimentais com candidíase sistêmica**

As alterações observadas nos animais experimentais iniciaram nas primeiras 72hs após a inoculação com *C. albicans*, sendo observadas no decorrer das quatro semanas do estudo alteração nos seguintes parâmetros clínicos: perda de peso, apatia, sangramento nasal, andar em círculo, lateralidade da cabeça, incoordenação e óbitos (Tabela 1).

Essas alterações analisadas estatisticamente resultaram em diferenças significativas quando comparados os animais pertencentes aos grupos T1, T2, T3 em relação ao controle negativo (T4) ( $p < 0,05$ ), sendo que o grupo diluente apresentou um maior número de

animais afetados em relação aos grupos tratados (Figura 1).

Tabela 1- Alterações clínicas observadas nos animais experimentais com candidíase sistêmica durante o período de 30 dias do estudo.

Sinais Clínicos	T1					T2					T3					T4				
	Avaliação					Avaliação					Avaliação					Avaliação				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Incoordenação	0	4	4	4	4	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	3	4	4	5
Lateralidade	0	3	4	4	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	2	4	4	5
Sangue Nasal	1	3	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3	3
Apatia	1	3	3	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	3	3	5	5	4
Andar círculos	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	3

\*Avaliação realizada a cada 6 dias, totalizando cinco observações, por animal em cada um dos grupos experimentais; T1: Tratado com óleo a 1,5%; T2: Tratado com óleo a 3%; T3: Tratados com Fluconazol (10mk/Kg); T4: Tratados com suspensão contendo 0,001% de Tween 80.

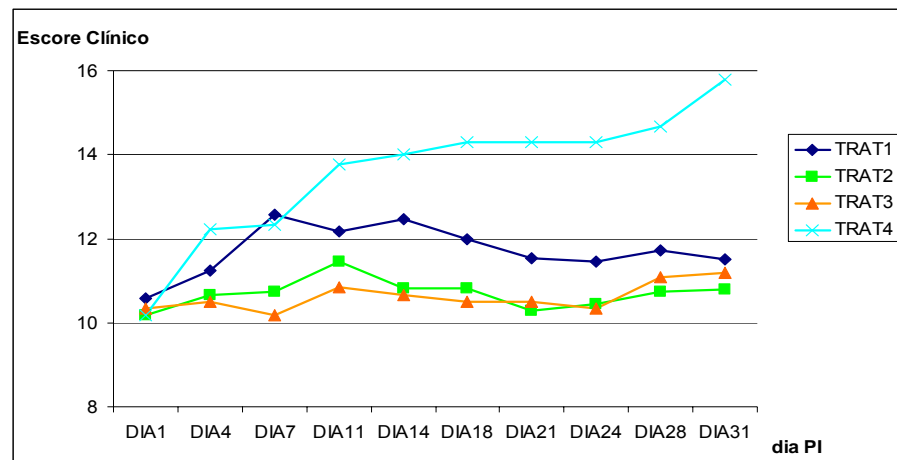


Figura 1: Análise por escore dos parâmetros clínicos avaliados nos quatro grupos de tratamento, observando diferença estatisticamente significativa no Grupo T4, quando comparado aos outros grupos (T1, T2, T3) ( $p < 0,05$ ).

Durante o período experimental, ocorreu o óbito de (4/12) dos animais pertencentes ao grupo T4, controle negativo, sendo que dois animais morreram nas primeiras 72hs do estudo, um no dia 4 e outro no dia 14. Um animal do grupo T1 teve morte natural no dia 14, e uma morte natural no grupo T2 no dia sete. Os resultados demonstraram diferenças

estatísticas ( $p=0,004$ ) entre o grupo T4 e os demais (T1, T2, T3). Todos os animais foram imediatamente necropsiados e coletados todos os órgãos para análise histopatológica.

#### **Avaliação do peso dos animais experimentais com candidíase experimental sistêmica**

Os animais foram pesados antes do início do experimento e semanalmente durante o período experimental. Os resultados das pesagens foram agrupados em média, sendo as médias de pesagens dos animais dos diferentes grupos de tratamento iguais a: T1= 322.60(B), T2= 339.26 (AB), T3= 355.03(A) e T4: 338.88 (AB). Observou-se que houve diferenças entre as médias de pesagens entre os tratamentos, o grupo T3 foi o mais pesado e o grupo T1 o mais leve. Os outros dois tiveram pesos intermediários, não diferindo estatisticamente dos demais. Não havendo diferença estatística na análise por semana (Figura 2).

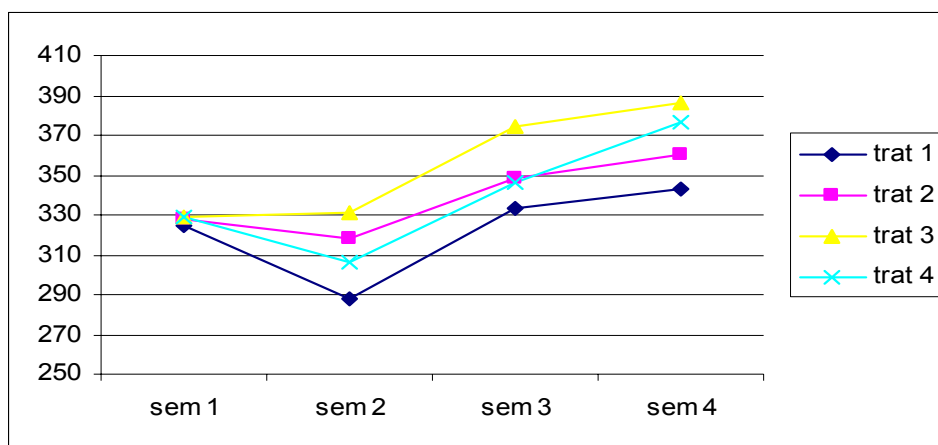


Figura 2: Média dos pesos dos animais experimentais pertencentes aos diferentes grupos de tratamento (T1,T2,T3,T4), nas quatro semanas do experimento.

Após a necropsia os principais órgãos foram pesados, sendo feito uma média da massa dos órgãos dos animais por grupo de tratamento, e uma média de peso corporal dos animais nos diferentes tratamentos, para o cálculo da massa relativa dos órgãos (Tabela 2). Foi observada uma maior massa relativa dos rins nos grupos T1 e T4, em todos órgãos avaliados o tratamento 4 teve uma massa relativa maior, porém sem apresentar diferenças estatísticas.

Tabela 2- Média de pesos dos órgãos em relação com a média de peso dos animais experimentais, e massa relativa dos órgãos, nos diferentes tratamentos ao final do período experimental.

Órgãos	T1		T2		T3		T4	
	Órgão/animal (%)		Órgão/animal (%)		Órgão/animal (%)		Órgão/animal (%)	
<b>Fígado</b>	16/413	3,87%	17,1/438	3,9%	15,8/401	3,9%	14,3/348	4,1%
<b>Baço</b>	0,7/413	0,17%	0,8/438	0,18%	0,8/401	0,2%	1,67/348	0,48%
<b>Pulmão</b>	2,68/413	0,65%	2,8/438	0,64%	2,2/401	0,55%	1,9/348	0,55%
<b>Coração</b>	1,12/413	0,275	1,1/438	0,25%	1,03/401	0,26%	1,08/348	0,31%
<b>Rins</b>	2,44/413	0,59%	1,47/438	0,34%	1,28/401	0,32%	2,4/348	0,69%
<b>Cérebro</b>	1,87/413	0,45%	1,07/438	0,24%	2,16/401	0,54%	2,1/348	0,6%
<b>Testículo</b>	2,39/413	0,58%	2,89/438	0,66%	2,6/401	0,65%	2,8/348	0,8%

(%): Massa relativa calculada como (Massa do órgão/massa corporal) x 100.

**T1:** Tratado com óleo a 1,5%; **T2:** Tratado com óleo a 3%; **T3:** Tratados com Fluconazol (10mk/Kg); **T4:** Tratados com suspensão contendo 0,001% de Tween 80.

### Alterações macroscópicas nos animais experimentais

Em relação às alterações macroscópicas observadas nos animais com candidíase experimental sistêmica, essas quando presentes se apresentaram na forma de lesões nodulares e esbranquiçadas especialmente nos rins, seguidos por fígado, baço, e bexiga, as lesões ocorreram de forma localizada ou disseminada. No cérebro observou-se perda das circunvoluções e alteração na consistência do órgão. Macroscopicamente o principal órgão afetado foram os rins, em alguns animais foi observado destruição da região medular do órgão, com presença de aglomerados de hifas, especialmente nos animais do grupo T4 (Tabela 3).

Tabela 3- Alterações macroscópicas observadas nos órgãos internos dos animais experimentais com candidíase sistêmica durante o período de quatro semanas.

Órgãos	T1	T2	T3	T4
Rins	10	6	2	12
Fígado	1	1	0	4
Baço	0	2	0	0
Pulmão	0	0	0	1
Cérebro	4	1	0	4
Bexiga	0	2	0	4

**T1:** Tratado com óleo a 1,5%; **T2:** Tratado com óleo a 3%; **T3:** Tratados com Fluconazol (10mk/Kg); **T4:** Tratados com suspensão contendo 0,001% de Tween 80.

Não houve diferenças entre os grupos de tratamento para as alterações macroscópicas nos órgãos avaliados, com exceção do rim, onde observou-se que os animais pertencentes ao grupo tratado fluconazol diferiram em relação aos demais grupos .

### **Obtenção do retroisolamento de *C. albicans***

A obtenção do retroisolamento de *Candida* foi realizada a partir do cultivo dos órgãos (rins, baço, fígado e cérebro) em meio ágar sabouraud dextrose a 35°C e da cultura de sangue e urina. Em nosso estudo a levedura foi retro isolada de órgãos vitais, sendo principalmente dos rins, além de ser isolada da urina e sangue confirmando o envolvimento sistêmico dos órgãos na candidíase experimental sistêmica em ratos wistar (Tabela 4).

Tabela 4 – Retroisolamento de *C. albicans* de órgãos vitais, sangue e urina dos animais experimentais após cultura em ágar Sabouraud dextrose a 35 °C.

<b>Órgãos</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
<b>Rins</b>	12 <sup>a</sup>	10 <sup>ab</sup>	7 <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup>
<b>Fígado</b>	9 <sup>ab</sup>	7 <sup>ab</sup>	5 <sup>b</sup>	11 <sup>a</sup>
<b>Cérebro</b>	9 <sup>ab</sup>	7 <sup>ab</sup>	4 <sup>b</sup>	12 <sup>a</sup>
<b>Sangue</b>	2	1	0	4
<b>Urina</b>	2	0	0	3

**T1:** Tratado com óleo a 1,5%; **T2:** Tratado com óleo a 3%; **T3:** Tratados com Fluconazol (10mg/Kg); **T4:** Tratados com suspensão contendo 0,001% de Tween 80.

A análise estatística do retroisolamento obtido a partir do cultivo dos órgãos específicos, não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos tratados, porém foi observada diferença entre o grupo T3 e T4 ( $p \leq 0,05$ ).

## **DISCUSSÃO**

O presente estudo ao desenvolver a Candidíase experimental sistêmica, revelou um quadro preocupante, a qual o veterinário não observa rotineiramente, já que as infecções sistêmicas são relatadas de forma isolada em animais, porém a possibilidade de disseminação de *Candida* spp. para diversos tecidos é uma realidade cada vez mais próxima da medicina veterinária, e a enfermidade se caracteriza por alta morbidade e mortalidade e

o profissional tem que estar preparando para o reconhecimento e administração da terapia adequada.

No estudo a levedura foi retro isolada de órgãos vitais, sendo principalmente dos rins e sistema nervoso, além de ser isolada da urina e sangue confirmando o desenvolvimento de candidíase sistêmica. Segundo a literatura, no caso de infecção sistêmica, o diagnóstico baseia-se na visualização e isolamento da levedura em diversos órgãos, ou em espécimes clínicos como na urina, aspirado, biopsia e sangue (Nucci et al., 1998; Kan & Lin, 2002; Diekema et al., 2002). Os animais durante o período experimental foram imunossuprimidos por terapia imunossupressora, sendo este um dos principais fatores associados à infecção sistêmica por *candida* (Nucci et al., 1998; Diekema et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2003).

Ao analisar a eficácia dos tratamentos (T1, T2, T3) na candidíase experimental sistêmica, observou-se que o fluconazol (T3) foi aquele em tivemos os melhores resultados, seguido pelo T2 (Óleo 3%) que obteve resultados que não diferiram significativamente do fluconazol (T3), estes resultados são muito promissores já que o óleo essencial apresentou resultados próximos ao antifúngico padrão utilizado. Em relação ao T1 (Óleo 1,5%), os parâmetros avaliados permitiram concluir que este, não foi tão eficaz quando comparado ao controle positivo (T3) e ao óleo a 3% (T2), porém foi melhor que o grupo controle negativo (T4). O fato do T3, apresentar os melhores resultados nos parâmetros avaliados, deve-se a indicação terapêutica deste antifúngico para o tratamento da candidíase disseminada, tendo em vista que o fluconazol apresenta eficácia, segurança e altos níveis de distribuição nos líquidos corpóreos (Santos Jr. et al., 2005; Castro et al., 2006; Colombo & Guimarães, 2007). O baixo peso molecular e a alta solubilidade do fármaco contribuem para a alta biodisponibilidade, o que permite que a maior parte dos pacientes sejam tratados por via oral, recebendo uma dosificação diária de 6 a 12 mg/kg/dia. (Farias & Giuffrida, 2002; Magill et al., 2006).

Com relação à atividade antifúngica do óleo essencial do *O. vulgare* frente a leveduras de interesse médico, vários estudos têm sido desenvolvidos (Lambert et al., 2001; Manohar et al., 2001; Chami et al., 2004; Giordani et al., 2006), porém com grandes variações quanto ao método de análise da suscetibilidade *in vitro*, quanto a modelos experimentais utilizados, composição do óleo essencial, assim como, utilização de

compostos isolados do óleo (Lambert et al., 2001; Manohar et al., 2001). Entretanto os estudos em modelos experimentais tem demonstrado boa atividade de alguns dos compostos isolados do óleo essencial, assim como do óleo puro. Manohar e colaboradores (2001), demonstrou que a administração oral diária de 8,6 mg do óleo de *Origanum* dissolvido em 100 µl de azeite de oliva em camundongos, pelo período de 30 dias, reduziram em 80% a mortalidade dos animais, demonstrando efeito terapêutico na candidíase sistêmica. Chami & Chami (2004), avaliaram *in vitro* e *in vivo* o carvacrol e eugenol no tratamento da candidíase, com resultados satisfatórios no controle da candidíase oral e vaginal experimental induzida por *Candida albicans* em ratos imunossuprimidos com valores comparáveis aos antifúngicos padrões.

Mesmo sendo reconhecidas as propriedades antimicrobianas, pertencentes às espécies de *Origanum*, o mecanismo de ação dos extratos e/ou óleo essencial ainda não está completamente elucidado, não se conhecendo o exato modo de ação frente aos fungos, porém diversos estudos têm sido conduzidos neste sentido. Segundo Lambert e colaboradores (2001), a ação antimicrobiana pode ser devido ao prejuízo à diferentes enzimas, principalmente aquelas envolvidas com a produção de energia e/ou síntese de componentes estruturais dos microrganismos. Outra hipótese estudada é de que os óleos essenciais sensibilizam a bicamada fosfolipídica da membrana celular do microrganismo, causando um aumento da permeabilidade e perdas de constituintes intracelulares vitais, ou causando a inibição ou danos nos sistemas enzimáticos (Cox et al., 2000). Alguns autores sugerem que a alteração na atividade dos canais de cálcio é a causa do aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes intracelulares, assim como um decréscimo no ATP intracelular nas células enquanto que, simultaneamente há aumento no ATP extracelular, ocasionando uma ruptura na membrana celular do microrganismo (Sikkema et al., 1995; Helander et al., 1998; Sartoratto et al., 2004).

Quando se refere a análise clínica dos animais experimentais observou-se o desenvolvimento de sinais compatíveis com a infecção sistêmica por *C. albicans*. A levedura é considerada a espécie com maior potencial patogênico, devido a fatores como formação de hifas/pseudo-hifas e tubo germinativo, além de secreção de enzimas hidrolíticas como fosfolipases e proteinases (Lacaz et al., 2002; Schaller et al., 2005; Castro et al., 2006). Após a multiplicação e invasão dos tecidos, as leveduras podem provocar

lesões superficiais, assim como se disseminar para diferentes órgãos como rins, pulmão, coração, articulações, ossos e sistema nervoso central (Lacaz et al., 2002; Castro et al., 2006).

As alterações neurológicas observadas nos animais experimentais neste estudo, como andar em círculo, lateralidade da cabeça e desequilíbrio, demonstraram o acometimento do sistema nervoso central durante a candidíase experimental, assim como o retroisolamento da levedura neste órgão. Segundo a literatura o envolvimento de sistema nervoso central ocorre com grande frequência em prematuros que desenvolvem candidemia (Diekema et al., 2002; Kan & Lin, 2002). Segundo dados obtidos em séries de necropsia, pacientes com sepsis por *Candida* que evoluem a óbito apresentam lesões fúngicas em sistema nervoso central em até 20% dos casos (Diekema et al., 2002; Kan & Lin, 2002; Colombo & Guimarães, 2003).

A evolução para o óbito ocorreu em 33% (4/12) dos animais pertencentes ao grupo T4, controle negativo, sendo que dois animais morreram nas primeiras 72hs do estudo, um no dia 4 e outro no dia 14. De forma geral, 40 a 60% dos pacientes que desenvolvem candidemia morrem durante a internação na qual houve a fungemia, sendo a alta mortalidade decorrência particularmente do diagnóstico tardio e à gravidade das comorbidades (Colombo & Guimarães, 2003).

Durante a necropsia foi observado lesões e destruição da região medular dos rins, com formação de bolas fúngicas no interior da região medular dos rins de alguns animais, especialmente nos animais do grupo T4. Esta observação não condiz com a afirmação de Souto & Dias (2003), que citam a necrose papilar e os micetomas ou bolas fúngicas, obstruindo a pelve renal ou o ureter, e a piodrose por fungos como complicações raras. O envolvimento renal é, em geral, secundário à doença sistêmica, podendo ser, entretanto, o único órgão afetado, podendo ser atingidos por via ascendente ou por via hematogênica (Lacaz et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2007). A *Candida* tem tropismo pelos rins, tendo sido demonstrado 90% de envolvimento renal em pacientes que foram à necropsia após candidíase generalizada (Souto & Dias, 2003).

No estudo o envolvimento de fígado e baço ocorreu de forma menos intensa quando comparado aos rins, o que concorda com dados de literatura. Segundo alguns autores, a candidíase hepatoesplênica é uma forma incomum de infecção pelo gênero *Candida* que



envolve primariamente o fígado e o baço e, menos freqüentemente, os rins, os pulmões e os ossos. Esta síndrome ocorre habitualmente em pacientes em tratamento intensivo para leucemia aguda, ou seja, pacientes imunocomprometidos e de difícil tratamento devido à neutropenia coexistente nesta população. A incidência estimada de candidíase hepatoesplênica em pacientes com leucemia aguda é em média 5% (Diekema et al., 2002; Kan & Lin, 2002; Colombo & Guimarães, 2007).

O baixo isolamento da levedura da urina (5/48) e do sangue (7/48) dos animais experimentais observado no estudo, provavelmente ocorreu de forma secundária à doença fúngica sistêmica. Sendo descrito na literatura que nos casos de pielonefrite adquirida por via hematogênica, decorrente de candidíase sistêmica, os rins funcionam como filtro e podem refletir contagens baixas na urina (Oliveira et al., 2001; Colombo & Guimarães, 2007). Havendo envolvimento renal como complicação de fungúria, há formação de microabscessos no córtex renal, com penetração das leveduras nos túbulos proximais e conseqüente excreção na urina (Fischer, 2000). No grupo tratado fluconazol não foram observados isolamentos em cultura urinária nem de sangue. Este fato deve-se a indicação terapêutica deste antifúngico, tendo em vista que o fluconazol apresenta eficácia, segurança e altos níveis na urina e no parênquima renal (Souto & Dias, 2003; Colombo & Guimarães, 2007).

## **CONCLUSÃO**

De acordo com os resultados pode-se concluir que o óleo essencial do *Origanum vulgare* apresenta-se como um promissor agente antifúngico, demonstrando bons resultados no tratamento da candidíase experimental sistêmica, porém são necessários maiores estudos que possibilitem introduzir esta substância como opção terapêutica para candidíase.

## **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a CAPES; CNPq; FAPERGS e PROPESC/UFRGS.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismo de resistência da *Candida* spp. a antifúngicos. *Infarma*, v. 18, n. 9/10, 2006.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. *The Braz. J. Infec. Dis.*, v. 8, n. 3, p. 217-226, 2004.

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. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. *Rev. Vet. Zoot.*, n. 2, v. 14, 2007.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções por *Candida* spp. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Candidúria: uma abordagem clínica e terapêutica. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 40, n. 3, 2007.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Applied Microb.*, v. 88, p. 170-175, 2000.

DAFERERA, J. D.; ZIOGAS, N. B.; POLISSIOU, G. M. GC-MS analysis of essential oils from some Greeks aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *J. Agric. Food Chemistry*, n. 48, p. 2576-2581, 2000.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BRUEGGEMANN, A. B.; COFFMAN, S. L.; DOERN, G. V.; HERWALDT, L. A.; PFALLER, M. A. Epidemiology of candidemia: 3-year results from the emerging infections and the epidemiology of Iowa organisms study. *J. Clin. Microb.*, v. 40, p. 1298-1302, 2002.

FARIAS, M. R.; GIUFFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S.F. *Manual de Terapêutica Veterinária*. Rocca: São Paulo, p. 59-70, 2002.

FISCHER, J. F. Candiduria: when and how to treat it. *Cur. Infec. Dis. Report*, v. 2, p. 523-530, 2000.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAI, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. *Phytot. Res.*, v. 18, p. 990-995, 2004.

GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; MAILLARD, R. Les candidoses des carnivores domestiques actualisation à propos de 10 cas. *Point Vet.*, v. 28, p. 51-61, 1996.

HELANDER, I.K.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative bacteria. *J. Agric. Chem.*, v. 46, p. 3590-3595, 1998.

KAN, L. W.; LIN, J. D. Management of systemic candidal infections in the intensive care unit. *Amer. J. Health Syst. Pharmac.*, v. 59, p. 33-41, 2002.

LACAZ, C.S. **Tratado de micologia médica**. 9.ed., São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.

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 Microb.*, v. 91, p. 453-462, 2001.

MAGILL, S. S.; SHIELDS, C.; SEARS, C. L.; CHOTI, M.; MERZ, W. G. Triazole Cross-Resistance among *Candida* spp.: Case Report, Occurrence among Bloodstream Isolates, and Implications for Antifungal Therapy. *J. Clin. Microbiol.*, v. 44, p. 529–535, 2006.

MANOHAR, V; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; BAGGHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of *Origanum* oil against *Candida albicans*. *Molec. Cel. Bioch.*, v. 228, p. 111-117, 2001.

MORETTI, A. B.; POSTERARO, L.; BONCIO, L.; MECHELLI, E.; GASPERIS, F.; AGNETTI, M. RASPA. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnostic by PCR-REA. *Rev. Iber. Micol.*, v. 21, p. 139-142, 2004.

MORETTI, A. L.; BONCIO, B.; POSTERARO, L.; MECHELLI, M.; BALDUCCI. Co-cutaneous infection in a dog: pcr-reverse identification of *C. tropicalis* on skin biopsy. *J. Mycol. Med.* v. 16, p. 30-36, 2006.

MUELLER, R. S.; BETTENAY, S. V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous Candidiasis in a dog, caused by *Candida guilliermondii*. *Vet. Rec.*, v. 150, p. 728-730, 2002.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; SILVEIRA, F.; RICHTMANN, R.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; SPECTOR, N. Risk factors for death in patients with candidemia. *Infec. Contr. Hosp. Epidem.*, n. 19, p. 846-850, 1998.

SANTOS JR., I. D. S; SOUZA, I. A. M.; BORGES, R. G.; SOUZA, L. B. S.; SANTANA, W. J.; COUTINHO, H. D. M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. *Sc. Med.*, v. 15, n. 3, 2005.

SANT'ANA, P. L.; MILAN, E. P.; MARTINEZ, R. Multicenter brazilian of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v. 97, p. 253-7, 2002.

SARTORATTO, A. ; DUARTE, M. C. T. ; DELARMELINA, C. ; REHDER, V. L. G.; FIGUEIRA, G. M. ; MACHADO, A. L. M. . Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. SãoPaulo, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. v. 48, p.3 65-377, 2005.

SILVA, V.; DIAZ, M. C. J.; FEBRÉ, N. Y. Red de diagnostico em micologia medica. Vigilância da la resistência de leveduras a antifúngicos. *Rev. Chil. Infectol.* v. 19, n. 2, 2002.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiol. Rev.*, v. 59, p. 201-222, 1995.

SOUTO, C. A. V., DIAS, B. S. Infecção do Trato Urinário por Fungos. *Intern. Braz. J. Urol.*,v. 29,s. 3, p. 21-27, 2003.

OLIVEIRA, R. D. R.; MAFFEI, C. M. L.; MARTINEZ, R. Infecção urinária hospitalar por leveduras do gênero *Candida*. *Rev Assoc Med Bras.*, v. 47, p. 231-235, 2001.

YAMAGUCHI, H. (1987). In: M. Miyaji(Ed.1). *Opportunistic Fungal Infections. Candidiasis in Animal Models in Medical Mycology*. CRC Press: Boca Raton. pp. 111-112 e 144-151, 1987.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O óleo essencial do *Origanum vulgare* demonstrou atividade *in vitro* frente ao *Sporothrix schenckii* e *Candida* spp., com diferenças de suscetibilidade dos microrganismos quando comparado diferentes óleos, atribuída a composição química do extrato. A utilização do óleo à 3%, via oral e intra-vaginal por 30 dias não causa alterações relevantes em ratas Wistar, demonstrando segurança quanto ao uso nesta concentração. Além disso, o uso do óleo a 3% demonstrou bons resultados no tratamento da candidíase experimental sistêmica.

As plantas medicinais ou aromáticas, assim como seus óleos essenciais, têm despertado grande interesse, especialmente o *Origanum vulgare* (orégano), devido à presença de compostos fenólicos, que em nosso estudo foram encontrados em todos os oito óleos estudados.

Devido à crescente importância das micoses, tanto em medicina humana assim como em veterinária, um investimento significativo é necessário para a próxima geração de fármacos com ação antifúngica, a fim de obter-se produtos com amplo espectro de ação, seguro em doses eficazes e com custo acessível, sendo que os organismos vegetais podem representar uma ótima alternativa.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAM, K.; SIVROPOULOU, A.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antifungal activities of *Origanum vulgare* hirtum, Mentha Spicata, Lavandula angustifolia, and Salvia fruticosa Essential Oils against Human pathogenic fungi. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 1739-1745, 1989.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ALLINGER, N. L. **Química Orgânica**, 2<sup>a</sup> ed., LTC: Rio de Janeiro, 1976, p. 672-677.
- AMOROSO, M. C. M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, p. 189-203, 2002.
- AMZALLAG, G. N.; LARKOV, O.; BEN HUR, M.; DUDAI, N. Soil microvariations as a source of variability in the wild: the case of secondary metabolism in *Origanum dayi* Post. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 6, p. 1235-1254, 2005.
- ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 723-728, 2001.
- ARCILA-LOZANO, C. C.; LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; MEJÍA, E. G. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **ALAN**, v. 54, n. 1, 2004.
- ARENAS, R. Esporotricose. In: **Micologia medica ilustrada**. 1<sup>o</sup>ed. México: Nueva editorial interamericana, 1993, v. 1, cap. 13, p. 145-160.
- ARONSON, A.; AUCOIN, D. P. Medicamentos antimicrobianos In; **ETTINGER, S. J**, Tratado de medicina interna veterinária. Manole Ltda, 3<sup>o</sup>ed., v. 1, p. 402-431, 1992.
- BAMPIDIS, V. A.; CHRISTODOULOU, V., FLOROU-PANERI, P.; CHRISTAKI, E.; SPAIS, A. B.; CHATZOPOULOU, P. S. Effect of dietary dried oregano leaves supplementation on performance and carcass characteristics of growing lambs. **Animal Feed Science and Technology**, p. 1-11, 2005.
- BASILICO, M. Z.; BASILICO, J. C. Inhibitory effects of some spice essential oils on *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 growth and ochratoxin A production. **Letters Applied of Microbiology**, v. 29, p. 238-241, 1999.
- BARATTA, M. T.; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G.; BIONDI, D. M.; RUBERTO, G. Chemical composition antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary,

oregano and coriander essential oils. **Journal Essential Oil Research**, v. 10, n. 6, p. 618-627, 1998.

BARROS, M. B. L.; SCHUBACH, A. O.; DO VALLE, A. C. F.; GALHARDO, M. C. G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, T. M. P.; REIS, R. S.; WANKE, B.; MARZOCHI, K. B. F.; CONCEIÇÃO, M. J. Cat-transmitted sporotrichosis epidemic in Rio de Janeiro, Brazil: Description of a series of cases. **Clinical Infectious Diseases Society of America**, v. 38, p. 529-535, 2004.

BAYDAR, H.; SAGDIÇ, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 169-172, 2004.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: Uma Revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 159-172, 2004.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de Sensibilidade de Bactérias Frente a Óleos Essenciais de Algumas Plantas do Nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3, p. 80-83, 2005.

BILKEI, G.; GERTENBACH, W. Retrospektive Untersuchung des Kombination effects hoher Vitamin E- Undpflanzlicher Orégano-futterzusätze auf die Entwicklung von verzögert wachsenden Mastschweinen. **Biologische Tiermedizin**, v. 3, p. 83-87, 2001.

BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. **Schweiz. Arch. Tierheilk**, v. 134, p. 1-8, 1992.

BROWN, R. M.; ROGERS, K. S. Neutropenia in dogs and cats. **Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian**, v. 23, n. 6, p. 534-542, 2001.

BRUSTEIN, R.; ANDRADE, B. P. J.; ALMEIDA, T. M.; SILVA, K. P.; DAHER, G. A.; CARNEIRO, C. O.; FERREIRA, B. G. Esporotricose felina na cidade do Rio de Janeiro e alguns municípios vizinhos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, sup. 1, p. 132, 2000.

BUSSATA, C.; MOSSI, A. J.; RODRIGUES, M. R. A.; CANSIAN, R. L.; OLIVEIRA, J. V. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 610-616, 2007.

BUCHANAN, R. L.; SHEPHERD, A. J. Inhibition of *Aspergillus parasiticus* by timol. **Journal Food Science**, v. 46, p. 976-977, 1981.

CALUCCI, L.; PINZINO, C.; ZANDOMENEGHI, M.; CAPOCCHI, A.; GHIRINGHELLI, S.; SAVIOZZI, F.; TOZZI, S.; GALLESCHI, L. Effects of  $\gamma$  - irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 51, p. 927-934, 2003.

- CAPECKA, E.; MARECZEK, A.; LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some *Lamiaceae* species. **Food Chemistry**, p.1-4, 2005.
- CARLOTTI, D. N. Canine and feline superficial fungal skin infections. **Veterinary Quarterly**, v. 19, sup. 1, p. 45-46, 1997.
- CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, p. 39-49, 2006.
- CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. *Plantas Mediciniais, condimentares e aromáticas: Descrição e Cultivo*. Livraria e Editora Agropecuária: Guaíba, 1995, p. 9-10.
- CASTRO, A. P.; NOBRE, M. O.; CAETANO, D.; SOUZA, L. L.; MEIRELES, M. C. A.; FERREIRO, L. Recorrência de esporotricose em gatos com envolvimento zoonótico. **Ciência Animal**, v. 11, sup. 1, p. 187, 2001.
- CASTRO, T. L.; COUTINHO, H. D. M.; GEDEON, C. C.; SANTOS, J. M.; SANTANA, W. J.; SOUZA, L. B. S. Mecanismo de resistência da *Candida* spp. a antifúngicos. **Infarma**, v. 18, n. 9/10, 2006.
- CLEFF, M. B.; LIMA, A. P.; FARIA, R. O.; MEINERZ, A. R. M.; ANTUNES, T. A.; ARAÚJO, F. B.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *candida* spp from vaginal microbiota of healthy canine females in relationship with oestral cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 201-204, 2005.
- 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. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Revista Veterinária e Zootecnia**, v. 2, n. 14, 2007.
- CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **The Brazilian Journal Infections Diseases**, v. 8, n. 3, p. 217-226, 2004.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytoterapy Research**, v. 15, p. 183-205, 2001.
- CORRÊA, G. S. S.; GOMES, A. V. C.; CORRÊA, A. B.; SALLES, A. S. Utilização de antibióticos e probióticos como promotores de crescimento na alimentação de frangos de corte. **Ciências da Vida**, v. 22, n. 2, p. 75-81, 2002.
- COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p. 170-175, 2000.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural Products in drug discovery and development. **Journal Natural Products**, n. 60, p. 52, 1997.



- DAFERERA, J. D.; ZIOGAS, N. B.; POLISSIOU, G. M. GC-MS analysis of essential oils from some Greeks aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 2576-2581, 2000.
- DAOUK, R. K.; DAGHER, S.; SATTOUT, E. Antifungal activity of essential oil of *Origanum syriacum* L. **Journal of Food Protection**, v. 58, p. 1147-1149, 1995.
- DAVIS, B. A. Sporotrichosis. **Dermatology Clinical**, v. 14, n. 1, p. 69, 1996.
- DIXON, D. M.; DUNCAN, R. A.; HURD, N. J. Use of a mouse model to evaluate clinical and environmental isolates of *Sporothrix spp.* From the Largest U.S. epidemic of sporotrichosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 30, n. 4, p. 951-954, 1992.
- DIAZ, M.; NEGRONI, R.; MONTERO-GEI, F.; CASTRO, L. G. M.; SAMPAIO, S. A. P.; BORELLI, D.; RESTREPO, A. A Pan-American 5-years study of fluconazole therapy for deep mycosis in the immunocompetent host. **Clinical Infections Diseases**, v. 14, sup. 1, p. 68-72, 1992.
- DONADEL, K. W.; REINOSO, Y. D.; OLIVEIRA, J. C.; AZULAY, R. D. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 68, n. 11, p. 45-52, 1993.
- DORMAN, H. J. D.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; DEANS, S. G. In vitro antioxidant activity of a plant essential oils and phytoconstituents. **Journal Essential Oil Research**, v. 12, n. 2, p. 241-248, 2000.
- DUNSTAN, R. W.; LANGHAM, R. F.; REIMANN, K. A.; WAKENELL, P. S. Feline sporotrichosis: a report of five cases with transmission to humans. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 15, n. 1, p. 37-45, 1986.
- ETTINGER, S. J. In: **Manual de medicina interna veterinária**. São Paulo: Manole, 1996, p. 176-187.
- FAHEY, J. V.; WIRA, C. R. Effect of menstrual status on antibacterial activity and secretory leukocyte protease inhibitor production by human uterine epithelial cells in culture. **The Journal of Infections Diseases**, v. 185, p. 1606-1613, 2002.
- FARIAS, M. R.; GIUFFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. São Paulo, Brasil. p. 59-70; 2002.
- FARIAS, M. R.; COSTA P. R. S.; FRANCO S. R. V. S.; FERREIRA, H. Esporotricose canina e felina. **Cães & Gatos**, n. 66, p. 30-38, 1997.
- FERREIRA, A. W.; AVILA, S. L. M. **Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 302p.

FERREIRO, L. Associação entre o isolamento de *Candida albicans* com a infecção pelo Vírus da leucemia Felina (FeLV). Tratamentos com corticosteróides ou antimicrobianos em gatos. **Acta Science Veterinary**, v.30, p. 179-183, 2002.

FLEURY, R. N.; TABORDA, P. R.; GRUPTA, A. K.; FUJITA, M. S.; ROSA, P. S.; WECKWERTH, A. C.; NEGRÃO, M. S.; BASTAZINI, I. Zoonotic sporotrichosis. Transmission to humans by infected domestic cat scratching: report of four cases in São Paulo. **Brazilian International Journal Dermatology**, v. 40, n. 5, p. 318-322, 2001.

FICA, A. C. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas – Primeira parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004.

FIDEL, J. R.; CUTRIGHT, J.; STEELE, C. Effects of reproductive hormones on experimental vaginal candidiasis. **Infection and Immunity**, v. 68, n. 2, 2000.

FOTOS, P. G.; HELLSTEIN, J. W. *Candida* and candidosis: epidemiology, diagnosis and therapeutic management. **Dental Clinics of North America**, v. 36, n. 4, p. 857-878, 1992.

FREITAS, D. C.; MORENO, G.; SALIBA, A. M. F.; BOTTINO, A. J.; MOS, E. N. Esporotricose em cães e gatos. **Revista da Faculdade de Medicina Veterinária**, v. 7, n. 2, p. 381-387, 1956.

FUSEK, M.; SMITH, E. A.; MONOD, M. *Candida parapsilosis* expresses and secretes two aspartic proteinases. **FEBS Letters**, v. 327, p. 108-112, 1993.

GABAL, M. A. Antifungal activity of ketoconazole with emphasis on zoophilic fungal pathogens. **American Journal Veterinary Research**, v. 47, p. 1229-1234, 1986.

GARCIA, V. M. N.; GONZALEZ, A.; FUENTES, M.; AVILES, M.; RIOS, M. Y.; ROJAS, M. G. Antifungal activities of nine tradicional Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 85-88, 2003.

GIANNENAS, I. P.; FLOROU-PANERI, M.; PAPAZHARIADOU, F.; CHRISTAKI, N. A.; BOTSOGLOU, A. B.; SPAIS. **Archives An. Nutrition**, v. 57, p. 99-106, 2003.

GUERRA, M. P. & NODARI, R. O. **Biodiversidade: Aspectos biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento.** 5<sup>a</sup>ed. Editora Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 2003, p. 13.

GUILLOT, J.; CHERMETTE, R.; MAILLARD, R. Les candidoses des carnivores domestiques actualisation à propos de 10 cas. **Point Vétérinaire**, v. 28, n. 175, p. 51-61, 1996.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2006.

- GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. Quantitative Chemobiology: A Guide into the Understanding of Plant Bioactivity. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 13, n. 6, p. 772 -776, 2002.
- HELANDER, L. M.; ALAKONI, H. L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, L.; SMID, E. J.; GORRIS, L. G. M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 46, p. 3590-3595, 1998.
- HOUMANI, Z. The Essential Oil Composition of Algerian Zaâtar: *Origanum* spp. and *Thymus* spp. **Journal of Herbs, Spice & Medicinal Plants**, v. 9, n. 4, p. 1049-6475, 2002.
- HUBE, R.; HESS, D.; BAKER, C. A. The role and relevance of phospholipase D1 during growth and dimorphism of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 147, p. 879-889, 2001.
- JAHAM, C; PARADES, M; PAPICH, M.G Traditional Antifungal Dermatologic Agents. **Compendium**, v. 22, p. 5, 2000.
- KABOUCHE, Z.; BOUTAGHANE, N.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, A.; AIT-KAKI, Z.; BENLABED, K. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. **International Journal of Aromatherapy**, v. 15, p. 129-133, 2005.
- KANO, R.; HATTORI, Y.; OKUZUMI, K.; MIYAZAKI, Y.; YAMAUCHI, R.; KOIE, H.; WATARI, T.; HASEGAWA, A. Detection and identification of *Candida* species by 25S ribosomal DNA analysis in the urine candidal cystitis. **Journal Veterinary Medicine Science**, v. 64, n. 2, p. 115-117, 2001.
- KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; VOKOU, D. Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. **Bioch System Ecol.**, v. 22, p. 517-528, 1994.
- KNOW-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. Sporotrichosis In: **Medical Mycology**. Lea & Fibeger, Philadelphia, p. 707-729, 1992.
- LACAZ, C. S.; PETTINATI, A. S; SALEBIAN, A. **Candidíases**. São Paulo: Ed. Universidade de São Paulo, 1980, 190p.
- LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Tratado de Micologia Médica**. 9.ed., São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p
- LAM, L. K. T.; ZHENG, B. Effects of essential oils on Glutation S-transferase activity in mice. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 39, p. 660-662, 1991.
- 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. **Journal Applied of Microbiology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LAPPIN, M. R. Feline zoonotic diseases. **Veterinary Clinical North American Small Animal Practice**, v.23, n. 1, p. 57-78, 1993.

LARSSON C. E.; GONÇALVES M. A.; ARAUJO V. C.; DAGLI M. L. Z.; CORREA B.; FAVA-NETO C. Feline sporotrichosis: clinical and zoonotic aspects. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 31, n. 5, p. 351-358, 1989.

LAW, D.; MOORE, C. B.; JOSEPH, L. A. High incidence of antifungal drug resistance in *Candida tropicalis*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 7, p. 241-245, 1996.

MANOHAR, V; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N. A.; BAGGHI, D.; PREUSS, H. G. Antifungal activities of Origanum oil against *Candida albicans*. **Molec. Cel. Bioch.**, v. 228, p. 111-117, 2001.

MARQUES, S. A.; FRANCO, S. R. V. S; CAMARGO, R. M. P.; DIAS, L. D. F. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 327-330, 1993.

MATOS, F. J. A. **Farmácias Vivas**. 2ªed., EUFC: Fortaleza, 1997, 179p.

MATSUMOTO, H.; SUGIURA, M.; HATA, Y.; NAKA, W. A case of fixed sporotrichosis with recurred in a child following itraconazole treatment. *Nippon Ishinki Gakkai Zasshi*, v. 41, n. 2, p. 83-87, 2000.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. spp. hirtum). **Food Chemistry**, v. 71, p. 79-83, 2000.

MOREIRA JUNIOR, J. P. R. **Estudo da associação entre o isolamento de *Candida albicans* e a detecção do Vírus da Leucose Felina (FeLV) em gatos da Região da Grande Porto Alegre**. Porto Alegre - RS. 73 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, RS, 2001.

MORETTI, A. B.; POSTERARO, L.; BONCIO, L.; MECHELLI, E.; GASPERIS, F.; AGNETTI, M.; RASPA. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnostic by PCR-REA. **Revista Iberoamericana Micologia**, v. 21, p. 139-142, 2004.

MORETTI, A. L.; BONCIO, B.; POSTERARO, L.; MECHELLI, M.; BALDUCCI. Co-cutaneous infection in a dog: pcr-reverse identification of *C. tropicalis* on skin biopsy. **Journal Mycologi Medicine**, v. 16, p. 30-36, 2006.

MUELLER, R. S.; BETTENAY, S. V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous Candidiasis in a dog, caused by *Candida guilliermondii*. **Veterinary Record**, v. 150, p. 728-730, 2002.

MÜLLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. **Dermatologia dos pequenos animais**. 5. ed., São Paulo: Manole, 1996, 1130p.

**National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts M27-A2. v. 22, n. 15, 2002.

NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v. 32, n. 1, p.175-184, 2002.

NISBET, L. J.; MOORE, M. Will natural products remain an important source of drug research for the future? **Current Opin. Biotechnology**, n. 8, p. 708-712, 1997.

NUCCI, M.; COLOMBO, A.L.; SILVEIRA, F.; RICHTMANN, R.; SALOMÃO, R.; BRANCHINI, M. L.; SPECTOR, N. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infections Controls Hospitalar Epidemiology**, n. 19, p. 846-850, 1998.

ODDS, F. C. Resistance of yeasts to azole-derivative antifungals. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v. 31, p. 463-471, 1993.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Tiphymurium*, *S. aureus* e *L. monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, p. 414-420, 2007.

PASTER, N.; JUVENT, B. J.; SHAAYA, E.; MENASHEROV, M. Inhibitory effect of oregano and thyme essential oils on mould and foodborne bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. Oxford: **Bacwell Scientific Publications**, v. 11, n. 1, p. 33-37, 1990.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais Atualidades, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.

PONCE, A. G.; FRITZ, R.; DEL VALLE, C.; ROURA, S. I. Antimicrobial activity of essential oil on the native microflora of organic Swiss chard. **LWT**. v. 36, p.679-684, 2003.

Porte, A.; Godoy, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.: Propriedades antimicrobianas e químicas do óleo essencial. **B.CEPPA**, v. 19, n. 2, 2001.

RAPOSO, J. B.; NOBRE, M. O.; FERNANDES, C. G.; PORTO, M. Candidíase cutânea em um canino. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia**. Uruguaiana, v. 2/3, n. 1, p. 11-14, 1996.

RIBEIRO, M. A.; DIETZE, R.; PAULA, C. R.; MATTA, D. A.; COLOMBO, A. L. Susceptibility profile of vaginal yeast isolates from Brazil. **Mycopathologia**, v. 151, n. 1, p. 5-10, 2001.

- RIPPON, J. W. A new era in antimycotic agents. **Archivos Dermatology**, v. 122, p. 399-402, 1986.
- RIPPON, J. N. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. In: **Medical Mycology**, Saunders, 1988, 797p.
- ROCHETE, F. ENGELEN, M. VANDEN BOSSCHE, H. Antifungal agents of use in animal health-practical applications. **Journal Veterinary Pharmacology and Therapy**, v. 26, n. 31-53, 2003.
- RODRIGUES, M. R. A.; **Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano**. 2002. 143f. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- RODRIGUEZ, M. C.; SOTOMAYOR, C.; COSTAMAGNA, M. E.; CABANILLAS, A. M.; RENTERIA, B. S.; MASINI, A. M.; CORREA, S. Immunocompetence of macrophages in rats exposed to *Candida albicans* infection and stress. **American Journal Phys. Cell.**, v. 284, n. 1, p. 111-118, 2003.
- SAHIN, F.; GULLUCE, M.; DAFERERA, D.; SOKMEN, A.; SOKMEN, M.; POLISSIOU, M.; AGAR, G.; OZER, H. Biological activities of the essential oils and methanol extracts of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, v. 15, p. 549-557, 2004.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infections Diseases**, v. 2, p. 73-85, 2002.
- SANT'ANA, P. L., MILAN, E. P., MARTINEZ, R. Multicenter brazilian of oral *Candida* species isolated from AIDS patients. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 253-7, 2002.
- SANTOS, R. I. In: **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento** – Metabolismo Básico e Origem dos Metabólitos Secundários; 4ª ed., Universidade/UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2002, p. 348-349.
- SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M., DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.
- SCHALLER, M.; BORELLI, C.; KORTING, H. C.; HUBE, B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. **Mycoses**, v. 48, p. 365-377, 2005.
- SCHUBACH, T. M. P.; OKAMOTO, T.; PELON, I. V.; MONTEIRO, D. F.; MELO, M.; REIS, R. S.; FIALHO-MONTEIRO, P. C.; BLANCO, T. C .M.; CUZZY-MAIA, T.; SCHUBACH, A. Clínica e terapêutica da esporotricose em gatos naturalmente infectados. **Ciência Animal**, v. 11, sup. 1, p. 193, 2001.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. D. E.; CUZZY-MAYA, T.; OKAMOTO, T.; REIS, R. S.; MONTEIRO, P. C.; GUTIERREZ-GALHARDO, M. C.; WANKE, B. Pathology of sporotrichosis in 10 cats in Rio de Janeiro. **Veterinary Record**, v. 152, n. 6, p. 172-175, 2003.

SCHUBACH, T. M. P.; SCHUBACH, A. O. Esporotricose em gatos e cães – revisão. **Clinica Veterinária**, São Paulo, v. 5, n. 29, p. 21-24, 2000.

SCOTT, D. W., MILLER, W. H., GRIFFIN, C. E. In: **Dermatologia de Pequenos Animais**, 5 ed., Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, p. 333-336.

SHERDING, R. G. In: **The Cat Diseases and Clinical Management**. Ed. Churchill Livingstone, v. 2, 1989, p. 1549- 1550.

SIDRIM, J. C.; MOREIRA, J. L. B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, 287p.

SIERRA, P.; GUILLOT, J.; JACOB, H.; BUSSIERAS, S.; CHERMETTE, R. Fungal flora on cutaneous and mucosal surfaces of cats infected with feline immunodeficiency virus or feline leukemia virus. **American Journal of Veterinary Research**, v. 61, n. 2, p. 158-161, 2000.

SILVA, M. R. R.; DE PAULA, C. R.; SILVA, S. C. Drug resistance of yeasts isolated from oropharyngeal candidiasis in AIDS patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 29, n. 4, 1998.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/Ed. UFSC, 2003. p. 468-495.

SOEJARTO, D.D. Biodiversity prospecting and benefit sharing: perspectives from the field. **Journal Ethnopharmacology**, v. 51, p. 1-15, 1996.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N.; BARBOSA FILHO, J. M. ORÉGANO (*ORIGANUM VULGARE* L., LAMIACEAE): UMA ESPECIARIA COMO POTENCIAL FONTE DE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS. **Revista Higiene Alimentar**, v. 19, n. 132, p. 40-45, 2005.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O. Sensitivity of spoiling and pathogen food-related bacteria to *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 37, p. 527-532, 2006.

SOUZA, J. J. Esporotricose em cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, Recife, 1957. **Anais**, Recife, p. 367-371.

SOUZA, L. L. ***Sporothrix schenckii*: estudo epidemiológico em população de gatos**. 2001. 32f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Veterinária – Universidade Federal de Pelotas, 2001.

SOUZA, L. L.; NASCENTE, P. S.; NOBRE, M. O.; MEINERZ, A. R. M.; MEIRELES, M. C. A. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal Microbiology**, v. 37, p. 303-305, 2006.

SOUZA, M. D. M.; PERES, M. R.; BERNARDES, M. A. A. G.; GUIMARÃES, L. O. F.; GAZÊTA, G. S.; GITTI, C. B.; ABOUD-DUTRA, A. E. Esporotricose felina e a importância zoonótica – relato de caso no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 7, sup. 1, p. 131, 2000.

TACHIBANA, T.; MATSUYAMA, T.; MUTSUYAMA, M. Involvement of CD4+, T cells and macrophages in acquired protection against infection with *Sporothrix schenckii* in mice. **Medical Mycology**, v. 37, n. 6, p. 397-404, 1999.

TANTAOU-ELARAKI, A.; FERHOUT, H.; ERRIFI, A. Inhibition of the fungal asexual reproduction stages by three Moroccan essential oils. **Journal Essential Oils Research**, v. 5, n. 5, p. 535-543, 1993.

TAYLOR, B. N.; STAIB, P.; BINDER, A.; BIESEMEIER, A.; SEHNAL, M.; RÖLLINGHOFF, M.; MORSCHHÄUSER, J.; SCHRÖPPEL, K. Profile of *Candida albicans*-Secreted Aspartic Proteinase Elicited during vaginal infection. **Infection and Immunology**, v. 73, n. 3; p. 1828-1835; 2005.

TSINAS, A. C. The art of orégano. Grain Feed & Milling **Technology**, p. 25-26, 1999.

TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Drogas Antimicrobiana. In: TORTORA, G.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. São Paulo, Brasil, p. 544-545, 2003.

VAGI, E.; RAPAVI, E.; HADOLIN, M.; VÁSA'RHELINÉ PERÉDI, K.; BALÁSZ, A.; BLÁZOVICS, A.; SIMÁNDI, B. Phenolic and tripterpenoid antioxidant from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 17-21, 2005.

VARGAS B, PARCHA C, ARENAS, E. R. Antifúngicos de uso clínico. Análisis de un Laboratorio de Micología. **Cienc Trab**, v. 7, n. 15, p. 9-16, 2005.

VATTEM, D. A.; RANDHIR, R.; SHETTY, K. Cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 2225-2238, 2005.

VELUTTI, A.; SANCHIS, V.; RAMOS, A. J.; EGIDO, J.; MARÍN, S. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, v. 89, p. 145-154, 2003.

VICHI, S.; ZITTERL-EGLESEER, K.; JUGI, M.; FRANZ, C. Determination of the presence of antioxidants deriving from sage and oregano extracts added to animal fat means of



assessment of the radical scavenging capacity by photochemiluminescence analysis. **Nahrung-Food**, v. 45, n. 2, p. 101-104, 2001.

VINCENZI, M.; STAMMATI, A.; VINCENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. **Fitoterapia**, v. 75, p. 801-804, 2004.

WILLEMSE, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos: guia para diagnóstico e terapia**. São Paulo: Manole, 1995. 141p.

WOLF & TRAY, A. M.; TRAY, G. C. Moléstias Micóticas Profundas. In: ETTINGER, S.; FELDMAN, E. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 4 ed., v. 1, São Paulo: Manole, 1997, p. 632-664.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Argos: Chapecó, 2001, 500p.

ZANANDREA, I.; JULIANO, D. S.; ANDRÉA, B. M.; JULIANE, L.; VERIDIANA, K. B. Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, sup. 01, p. 16-19, 2004.

ZAUGG, C.; BORG-VON, Z. M.; REICHARD, U. Secreted aspartic proteinase family of *Candida tropicalis*. **Infections and Immunidade**, v. 69, p. 405-412, 2001.

ZIARRUSTA, G. B. Vulvovaginitis candidíase. **Revista Iberoamericana de micologia**, v. 19, p. 22-24, 2002.