

## Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em isolados clínicos de *Aspergillus* spp.

[*In vitro* activity of essential oil of *Origanum vulgare* L. in clinical isolates from *Aspergillus* spp.]

L.G. Osório<sup>1</sup>, A.L. Silva<sup>1</sup>, A.O.S. Fonseca<sup>2</sup>, T.P. Dias<sup>1</sup>, O.A. Martins<sup>3</sup>, R.O. Faria<sup>3</sup>,  
M.C.A. Meireles<sup>3</sup>, M.B. Cleff<sup>3</sup>, R. Freitag<sup>3</sup>, J.R.B. Mello<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Aluno de pós-graduação - Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, RS

<sup>2</sup>Médica veterinária

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - Pelotas, RS

<sup>4</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS

### RESUMO

*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* são os mais importantes agentes etiológicos da aspergilose, relevante micose aviária, com tratamento ineficaz e altas taxas de mortalidade. Em vista da importância da aspergilose, da necessidade de prospectar novos fármacos e do potencial terapêutico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (OEO), o orégano, objetivou-se avaliar a sensibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Aspergillus* spp. em relação ao OEO. O óleo foi obtido por hidrodestilação em Clevenger, e a análise química realizada por cromatografia de massa (GC/MS). Observaram-se 15 diferentes compostos ativos, sendo 4-terpineol, hidrato de sabinene e timol os majoritários. Nos testes de microdiluição em caldo (Reference..., 2008), todos os isolados (n= 23) foram sensíveis ao OEO: *A. fumigatus* teve CIM entre 28,125mg/mL (0,1875%) e 450mg/mL (3,0%), *A. flavus* entre 112,5mg/mL (0,75%) e 450mg/mL, e *A. niger* 112,5mg/mL. CFM variou de 112,5mg/mL a 450mg/mL nos isolados de *A. fumigatus*, de 225mg/mL (1,5%) a 450mg/mL em *A. flavus*, e foi de 450mg/mL em *A. niger*. CIM e CFM foram idênticos em 6/14 isolados, o que demonstra que o óleo com a mesma concentração pode ter capacidade fungistática e fungicida. CIM 90 correspondeu à CIM máxima. Os resultados demonstram a atividade anti-*Aspergillus* do OEO, com CIM 90 de 450mg/mL (3%).

Palavras-chave: orégano, atividade anti-*Aspergillus*, Lamiaceae, antifungigrama

### ABSTRACT

*Aspergillus fumigatus*, *A. flavus* and *A. niger* are the most important etiological agents of aspergillosis, a relevant avian mycosis, with ineffective treatment and high mortality rates. Due the importance of aspergillosis, the necessity of prospection of new drugs and the therapeutic potential of the essential oil of *Origanum vulgare* L. (OEO), popularly known as oregano, aims to evaluate the *in vitro* sensitivity of *Aspergillus* spp. opposing to OEO. The oil was obtained by hydrodistillation in Clevenger, and the chemical analysis performed by mass chromatography (GC/MS). 15 different active compounds were observed, being 4-terpineol (18.4%), sabinene hydrate (15.6%) and thymol (13.6%), the majority components. In the *in vitro* susceptibility test, all strains showed sensitivity to OEO, MIC of *Aspergillus fumigatus* ranged from 28,125mg/mL (0,1875%) to 450mg/mL (3,0%), *A. flavus* 112,5mg/mL (0,75%) to 450mg/mL, and *A. niger* 112,5mg/mL. MFC ranged from 112,5mg/mL to 450mg/mL in the *A. fumigatus* isolates, 225mg/mL (1,5%) to 450mg/mL in *A. flavus*, and 450mg/mL for *A. niger*. The MIC and FMC values were identical in 6/14 of the isolated subjects, demonstrating that the oil with the same concentration can have fungistatic and fungicidal capacity. The results demonstrates anti-*Aspergillus* activities of OEO with CIM90 de 450mg/mL (3%).

Keywords: oregano, anti-*Aspergillus* activity, lamiacea, antifungigram

---

Recebido em 28 de junho de 2017

Aceito em 8 de janeiro de 2018

E-mail: luizaosorio@yahoo.com

## INTRODUÇÃO

*Aspergillus* spp. são fungos ubíquos cujos conídios infectantes estão constantemente em contato com diferentes sistemas dos animais, sem que haja infecção. Porém, quando ocorre desequilíbrio na relação entre fungo e hospedeiro, dependendo da imunidade do animal, do volume de conídios inalados e dos fatores de patogenicidade da cepa envolvida, pode-se desenvolver um quadro de aspergilose (Arné *et al.*, 2011; Munir *et al.*, 2017). Por participarem de diferentes formas de quadros clínicos, como aspergilose e micotoxicoses, *Aspergillus* spp. são considerados, por Cruz (2010), como os mais importantes fungos em medicina veterinária.

A aspergilose é causada por diferentes espécies do gênero *Aspergillus*, entre as quais se destaca *A. fumigatus*, responsável por mais de 90% dos casos da micose, seguido por *A. flavus* e *A. niger*. A doença acomete diversas espécies, porém aves são particularmente suscetíveis, sendo a enfermidade responsável por altas taxas de mortalidade em centros de reabilitação e zoológicos, em aviários comerciais e em ovos embrionados (Abundis-Santamaria, 2003; Munir *et al.*, 2017).

Em humanos, os antifúngicos de eleição para aspergilose são voriconazol (Pagano, 2010) e anfotericina B (Filippin e Souza, 2006), entretanto, em medicina veterinária, destaca-se o uso do itraconazol (Nobre *et al.*, 2002; Beernaert *et al.*, 2009; Munir *et al.*, 2017). Porém, apesar de os antifúngicos estarem padronizados para uso em aves, na maioria dos casos o tratamento é ineficaz. A esse quadro se somam agravantes como a interrupção ou a não adoção da terapia, devido ao alto custo do tratamento e à resistência fúngica. *A. fumigatus* com resistência cruzada ao itraconazol e voriconazol, isolados de aspergilose aviária, já foram relatados por Beernaert *et al.* (2009), que consideraram baixa a possibilidade de aves e humanos infectados com estes isolados responderem à terapia antifúngica conhecida. Tais dados instigam, ainda mais, as crescentes buscas por novos antimicrobianos nos óleos essenciais (Fukayama *et al.*, 2005). Nessa linha, ao se comparar carvacrol, um monoterpene fenólico bastante identificado em óleos essenciais de plantas aromáticas, com voriconazol como profiláticos e no tratamento da

aspergilose aviária, ambos apresentaram bons resultados, porém o uso do carvacrol ainda reduziu as taxas de colesterol e provocou menores perdas econômicas (Tartor e Hassan, 2017).

*Origanum vulgare* L. (orégano) tem-se mostrado promissor em estudos de bioprospecção, com atividade antimicrobiana *in vitro* e *in vivo* em relação a diversas espécies de fungos e bactérias (Cleff *et al.*, 2010b; Mitchell *et al.*, 2010; Cleff *et al.*, 2013). No óleo essencial de orégano, foram descritos em torno de 34 compostos ativos, entre os quais 80 a 98% são fenóis, considerados os responsáveis pela atividade antimicrobiana e antioxidante (Kabouche *et al.*, 2005). Em contrapartida, o extrato aquoso tem apenas cerca de 22% de compostos fenólicos (Scientific..., 2010). Sabendo-se que altas concentrações desses compostos e a sua relação são de grande importância para a eficácia dos extratos (Kabouche *et al.*, 2005), fica evidente que estudos que visem a atividade antimicrobiana conduzidos com o óleo essencial sejam mais promissores do que quando conduzidos com os demais extratos.

Em vista dessa realidade, o presente estudo teve como objetivo realizar testes de sensibilidade *in vitro* de *Aspergillus* spp. isolados, provenientes de casos clínicos de aspergilose aviária ao óleo essencial de *O. vulgare*.

## MATERIAL E MÉTODOS

O *O. vulgare* foi adquirido em distribuidor comercial, com certificação botânica, e as folhas secas submetidas à hidrodestilação em Clevenger para obtenção do óleo essencial. A análise cromatográfica do óleo foi realizada em cromatógrafo gasoso com detector de ionização de chama (GC/MS), caracterizado em função dos principais constituintes químicos e comparado com o tempo de retenção de padrões. Após a extração e análise, o óleo foi armazenado em frascos de vidro âmbar e mantido sob refrigeração, conforme descrito por Hollenbach *et al.* (2015).

Os isolados utilizados de *Aspergillus* spp. foram provenientes da micoteca do Laboratório de Doenças Infecciosas da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (MicVet – UFPel). Foram utilizados 23 isolados: A.

*fumigatus* (n= 18), *A. flavus* (n= 3) e *A. niger* (n= 2) provenientes de casos clínicos de aspergilose em pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*), coletados *post mortem* de trato respiratório.

Os testes de sensibilidade *in vitro* com *Aspergillus* spp. foram realizados de acordo com a normativa CLSI M38-A2 (Reference..., 2008) adaptada para óleo essencial. As colônias do gênero *Aspergillus* foram repicadas em ágar batata (PDA) e incubadas a 37°C durante sete dias. Decorrido esse período, foram cobertas com 1,0mL de solução salina 0,85% estéril e uma gota de *tween* 20, e então a solução foi transferida para tubo de ensaio estéril. Após três a cinco minutos, a suspensão homogênea superior foi transferida para outro tubo estéril e homogeneizada em um agitador de tubos Vortex® durante 15 segundos, e sua concentração final foi ajustada a  $5 \times 10^4$  UFC/mL.

Utilizaram-se microplacas com 96 orifícios, com a primeira coluna como controle para crescimento fúngico (controle positivo), e a última como controle de esterilidade (controle negativo). O óleo essencial de orégano foi utilizado em 10 diferentes concentrações no meio RPMI, indo de 900mg/mL (6,0%) até 1,65mg/mL (0,011%), em diluições seriadas em base log2, distribuídas no sentido das linhas das microplacas. Da segunda à 10ª coluna, foi distribuído 0,1mL do inóculo em triplicata. As microplacas foram, então, incubadas em estufa *Shaker* (Certomat® BS-1), regulada a uma temperatura de 35°C e constante agitação (40 ciclos/min), para homogeneização do óleo ao meio de cultura. A leitura das microplacas foi realizada visualmente após 96 horas, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) como a menor concentração do óleo necessária para inibir o crescimento fúngico. Já a concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada pelo subcultivo de todos os poços da microplaca que não apresentaram crescimento fúngico visível, sendo a CFM considerada a menor concentração que impediu crescimento do fungo no subcultivo. CIM 50, CIM 90 e CIM máxima foram definidas como as menores concentrações capazes de inibir, respectivamente, o crescimento de 50%, 90% e de todos os isolados testados.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise do óleo essencial do orégano obtido resultou na identificação de 15 diferentes compostos ativos, todos apresentando probabilidade superior a 92%, conforme demonstrado na Fig. 1, com os picos numerados, e detalhados na Tab. 1.

Os componentes majoritários encontrados no óleo essencial de *O. vulgare* utilizado no estudo foram 4-terpineol (18,4%), hidrato de sabinene (15,6%) e timol (13,6%), respectivamente, os mesmos encontrados em estudo toxicológico com óleo essencial de orégano, porém com maior percentual para sabinene, seguido de timol e de 4-terpineol (Hollenbach, 2013). Da mesma forma, Soliman *et al.* (2009), visando à análise cromatográfica de amostras de óleo essencial de *O. majorana*, extraídos em diferentes épocas do ano, encontraram os mesmos componentes majoritários, também em concentrações variadas entre as amostras estudadas. Já Cleff *et al.* (2010b) obtiveram 4-terpineol e timol como componentes majoritários do óleo de orégano, não sendo citado hidrato de sabinene. Em estudo envolvendo cinco diferentes amostras de óleo essencial de orégano, foram encontrados 17 diferentes compostos, porém o carvacrol foi o componente majoritário em todas as amostras; já o timol esteve presente em três, sendo o segundo componente em maior concentração em dois dos óleos estudados (Silva *et al.*, 2010). Ao compilar esses estudos, confirma-se a existência de grande variabilidade de componentes em diferentes amostras de óleos essenciais de orégano, conforme já foi relatado por D'Antuono *et al.* (2000).

Diferentes autores creditam a atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano à presença principalmente de timol e carvacrol como componentes majoritários (Kabouche *et al.*, 2005; Chatzifragkou *et al.*, 2011; Tartor e Hassan, 2017). Contudo, mesmo sem identificação de carvacrol no óleo utilizado no presente estudo, demonstrou-se atividade *in vitro* em relação a *Aspergillus* spp., tanto como fungistático, quanto como fungicida, o que corrobora o proposto por Cleff *et al.* (2013) de que a associação dos diferentes compostos dos óleos essenciais, em detrimento de seus componentes isolados, é responsável pela atividade antifúngica.

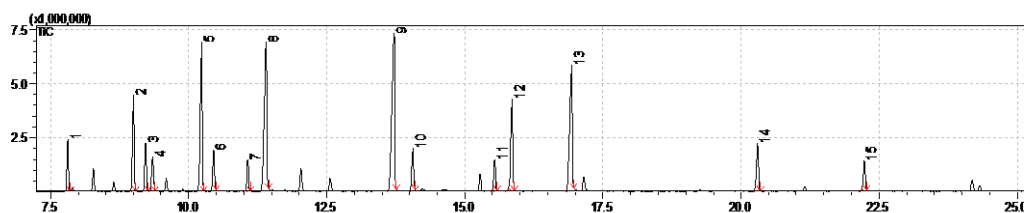


Figura 1. Espectro de CG/MS do óleo essencial de orégano, mostrando como compostos majoritários 4-terpineol (pico 9), hidrato de sabinene (pico 8) e timol (pico 13).

Tabela 1. CG/MS de óleo essencial de orégano

Pico					
Número	Composto	Tempo	Área	% de área	CG/MS %*
1	$\beta$ -terpineno	7,858	4740644	3,40	95
2	4-carene	9,042	9258878	6,63	97
3	cymol	9,267	4686883	3,36	96
4	$\beta$ -phellandrene	9,392	3827719	2,74	92
5	gamma-terpinen	10,275	17291793	12,39	97
6	4-isopropyl-1-methyl-2-cyclohexen-1-ol	10,500	4022179	2,88	92
7	2-carene 5-isopropyl-2-	11,117	2954008	2,12	96
8	methylbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol (sabinene hydrate)	11,450	21703165	15,55	96
9	3-cyclohexen-1-ol, 4-methyl-1-(1-methylethyl)-, (R)- (terpinen-4-ol)	13,758	25719274	18,42	98
10	alpha-terpineol	14,108	4628508	3,32	98
11	thymol methyl ether	15,583	3074301	2,20	97
12	linalool acetate	15,900	10391631	7,44	95
13	thymol	16,975	18998356	13,61	96
14	caryophyllene	20,350	5312380	3,81	97
15	gamma-elemene	22,275	2976671	2,13	93

\*Probabilidade.

No teste de microdiluição em caldo, todas as cepas apresentaram sensibilidade ao óleo essencial de orégano, com CIM variando entre 28,125mg/mL (0,1875%) e 450mg/mL (3,0%) e CFM entre 112,5mg/mL (0,75%) e 450mg/mL (3,0%), conforme demonstrado na Tab. 2. A sensibilidade de todos os isolados ao óleo reforça a teoria de que óleos essenciais são estruturas complexas e suas atividades biológicas estão amplamente relacionadas à associação de diferentes compostos (Tisserand e Young, 2014). CIM 50 foi de 112mg/mL (0,75%) e CIM 90 e CIM máxima foram de 450mg/mL (3,0%), ou seja, futuros testes *in vivo* devem partir da concentração de 450mg/mL. Em estudo que confrontou timol, carvacrol e óleo essencial de *O. vulgare* com bactérias, constatou-se que o efeito antibacteriano do óleo foi superior ao

encontrado quando utilizados os compostos isolados. Os autores citam o sinergismo entre os componentes do óleo essencial como um dos fatores determinantes para seus resultados; em contrapartida, questionam a possibilidade de haver efeito antagônico, dependendo da combinação desses componentes (Lambert *et al.*, 2001).

O 4-terpineol, componente majoritário do óleo testado, é um monoterpeneo de ação farmacológica comprovada, presente em diversas plantas como componente majoritário, sendo o principal responsável por seus efeitos farmacológicos. Óleos contendo altas concentrações de 4-terpineol podem, ainda, favorecer no tratamento *in vivo* de aspergilose, não só por sua atividade antimicrobiana, mas

também pela atividade redutora de pressão arterial e baixa toxicidade (Joca, 2010). Como a micose acomete principalmente o sistema respiratório das aves, acarretando oxigenação deficiente e consequente hipertensão pulmonar,

propiciando a ocorrência de síndrome ascítica (Jaenisch *et al.*, 2001), o uso do óleo com capacidade hipotensora poderia reduzir os sinais clínicos respiratórios e auxiliar na cura e no bem-estar animal.

Tabela 2. Relação entre CIM e CFM dos isolados de *Aspergillus* spp. (MicVet-UFPEL), provenientes de casos clínicos de aspergilose em pinguins-de-Magalhães (*Spheniscus magellanicus*) utilizados em teste de sensibilidade *in vitro* ao óleo essencial de *Origanum vulgare*

Isolados	CIM (%)	CFM (%)
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA1)	1,5	3,0
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA2)	1,5	3,0
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA3)	3,0	3,0
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA4)	1,5	1,5
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA5)	0,75	0,75
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA6)	0,75	1,5
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA7)	0,1875	0,75
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA8)	0,75	0,75
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA9)	0,75	0,75
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA10)	3,0	3,0
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA11)	0,75	1,5
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA12)	0,1875	0,75
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA13)	1,5	3,0
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA14)	0,75	0,75
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA15)	0,75	0,75
<i>A. fuimgatus</i> (MicVetA16)	0,75	1,5
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA17)	0,75	0,75
<i>A. fumigatus</i> (MicVetA18)	1,5	3,0
<i>A. flavus</i> (MicVetA19)	3,0	3,0
<i>A. flavus</i> (MicVetA20)	0,75	1,5
<i>A. flavus</i> (MicVetA21)	1,5	3,0
<i>A. niger</i> (MicVetA23)	0,75	3,0
<i>A. niger</i> (MicVetA24)	0,75	3,0

Assim como no presente estudo, o qual revelou forte atividade anti-*Aspergillus* do OEO, que provocou a inibição de todas as cepas fúngicas ensaiadas, Carmo *et al.* (2008) observaram sensibilidade de isolados do gênero *Aspergillus* ao OEO, porém em concentrações maiores, e efeito fungicida em relação a apenas algumas cepas. Já Mitchell *et al.* (2010) testaram um óleo essencial de orégano diante de cinco diferentes *Aspergillus* spp., o qual apresentou efeito inibitório sobre todas as cepas, com CIM inferior à CFM em todas, diferentemente do observado no presente estudo, no qual foram obtidos efeitos fungistático e fungicida em relação a cepas ensaiadas, com 42% (10/24) de coincidência entre CIM e CFM, o que demonstra que uma mesma concentração do óleo tem tanto

capacidade de inibir quanto de debelar o fungo. Cleff *et al.* (2010a) obtiveram todos os resultados de CIM inferiores às apresentadas no presente estudo, com 0,06% para duas amostras de *A. flavus* e uma de *A. fumigatus*, e 0,03% para um isolado de *A. fumigatus*. A variedade das concentrações observadas pelos diferentes autores pode ser justificada por fatores individuais tanto dos agentes quanto dos óleos ensaiados.

Neste estudo, foram utilizados somente isolados patogênicos de *Aspergillus* spp., uma vez que todas as amostras eram provenientes de casos clínicos que evoluíram para óbito, tendo como *causa mortis* aspergilose. Zanandrea *et al.* (2004) trabalharam com testes de sensibilidade *in vitro*

de fungos patogênicos do arroz e relataram atividade antimicrobiana do OEO em altas concentrações (óleo puro, 1:2; 1:4; 1:8; 1:16; 1:32), tendo os melhores resultados quando da utilização do óleo a 100%. O presente estudo trabalhou com menores concentrações, obtendo, também, resultados satisfatórios. Apenas três isolados (dois *A. fumigatus* e um *A. flavus*) apresentaram CIM com a maior concentração obtida entre todos os isolados (3%). Fatores individuais do fungo podem influenciar em sua patogenicidade e resistência antimicrobiana, o que justifica a grande variação entre a sensibilidade microbiana mesmo quando comparada dentro de uma mesma espécie. Ao compararem bactérias de casos clínicos de pododermatite aviária, Osório *et al.* (2013) demonstraram que isolados de mesmo gênero, quando confrontados com antimicrobianos de uso rotineiro em medicina veterinária, apresentaram resultados diferentes de sensibilidade aos fármacos, o que reforça que fatores individuais do micro-organismo têm influência sobre sua sensibilidade a determinados agentes.

O presente estudo é pioneiro no que tange à sensibilidade de isolados de aspergilose aviária em relação ao óleo essencial de orégano e demonstra o potencial deste para novos estudos, incluindo testes de toxicidade e sensibilidade *in vivo* que utilizem aves como animais experimentais. Estudos anteriores, realizados com ratos (*Rattus norvegicus*), determinaram que o óleo essencial de *O. vulgare* L. a 3% não apresentou toxicidade sistêmica nem reprodutiva (Cleff *et al.*, 2008; Hollenbach, 2013), o que cria perspectivas de uso terapêutico do orégano, abrindo, dessa forma, caminhos para estudos mais aprofundados com extratos da planta, incluindo testes *in vivo*.

### CONCLUSÕES

O óleo essencial de orégano utilizado no estudo apresentou 4-terpineol, hidrato de sabinene e timol como componentes majoritários. Todos os isolados de *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* apresentaram sensibilidade a esse óleo essencial, que demonstrou atividade fungicida e fungistática, com CIM 90 e CIM máxima de 450mg/mL (3%).

### AGRADECIMENTOS

Capes, CNPq, MicVet-UFPel, PPGCV-UFRGS.

### REFERÊNCIAS

- ABUNDIS-SANTAMARIA, E. *Aspergillosis in birds of prey*. Reino Unido: National Aspergillosis Center and University of Manchester, 2003. Available in: <<http://www.aspergillus.man.ac.uk>>. Accessed in: 15 Oct. 2005.
- ARNÉ, P.; THIERRY, S.; WANG, D. *et al.* *Aspergillus fumigatus* in poultry. *Int. J. Microbiol.*, v.2011, p.1-14, 2011.
- BEERNAERT, L.A.; PASMANS, F.; WAUYENBERGHE, L.V. *et al.* Avian *Aspergillus fumigatus* strains resistant to both itraconazole and voriconazole. *Antimicrobiol. Agents Chemoth.*, v.53, p.2199-2201, 2009.
- CARMO, E.S.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L. Potencial do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae) em inibir o crescimento de algumas cepas de *Aspergillus* de interesse em alimentos. *Braz. J. Microbiol.*, v.39, p.1-12, 2008.
- CHATZIFRAGKOU, A.; PETROU, I.; GARDELI, C. *et al.* Effect of *Origanum vulgare* L. essential oil on growth and lipid profile of yarrowia lipolytica cultivated on glycerol-based media. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, v.88, p.1955-1964, 2011.
- CLEFF, M.B.; MADRID, I.; MEINERZ, A.R. *et al.* Essential oils against *Candida* spp: in vitro antifungal activity of *Origanum vulgare*. *Afr. J. Microbiol. Res.*, v.7, p.2245-2250, 2013.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.O. *et al.* Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, p.1291-1294, 2010a.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; SALLIS, E.S. *et al.* Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em ratas Wistar. *Latin Am. J. Pharmacy*, v.27, p.704-709, 2008.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; XAVIER, M. *et al.* In vitro Activity Of *Origanum vulgare* Essential Oil Against *Candida* Species. *Braz. J. Microbiol.*, v.41, p.116-123, 2010b.
- CRUZ, L.C.H. *Micologia veterinária*. Rio de Janeiro: Revinter, 2010. 348p.
- D'ANTUONO, L.F.; GALLETI, G.C.; BOCCHINI, P. Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy). *Ann. Botany*, v.86, p.471-478, 2000.

- FILIPPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Rev. Bras. Ciênc. Farm.*, v.42, p.167-194, 2006.
- FUKAYAMA, E.H.; BERTECHINI, A.G.; GERLDO, A. *et al.* Extrato de orégano como aditivo em rações para frangos de corte. *Rev. Bras. Zootec.*, v.34, p.2316-2326, 2005.
- HOLLENBACH, C.B. *Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (Origanum vulgare L.) em ratos wistar*. 2013. 109f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS.
- HOLLENBACH, C.B.; SANTOS, M.F.; MELLO, F.P.S. *et al.* Avaliação do potencial genotóxico do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em ratos Wistar por meio do teste de micronúcleos. *Rev. Bras. Biocienc.*, v.12, p.66-71, 2015.
- JAENISCH, F.R.F.; ÁVILA, A.S.; MAZZUCO, H. *et al.* Síndrome da hipertensão pulmonar: a ascite em frangos de corte. Concórdia, SC: Embrapa, 2001. 16p. (Circular Técnica).
- JOCA, R.P.M.M. *Ação vasorelaxante do terpinen-4-ol em aorta torácica de ratos*. 2012. 95f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, CE.
- KABOUCHE, Z.; BOUTAGHANE, N.; LAGGOUNE, S. *et al.* Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Int. J. Aromather.*, v.15, p.129-133, 2005.
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, D.N.; COIOTE, P.J.A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, v.91, p.453-462, 2001.
- MITCHELL, T.C.; STAMFORD, T.L.M.; SOUZA, E.L. *et al.* Origanum vulgare L. essential oil as inhibitor of potentially toxigenic *Aspergilli*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.30, p.755-760, 2010.
- MUNIR, M.T.; REHMAN, Z.U.; SHAH, M.A.; UMAR, S. Interaction of *Aspergillus fumigatus* with respiratory system in poultry. *Worlds Poult. Sci. J.*, v.73, p.321-336, 2017.
- NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A. *et al.* Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. *Ciênc. Rural*, v.32, p.175-184, 2002.
- OSÓRIO, L.G.; XAVIER, M.O.; LADEIRA, S.R.L. *et al.* Study of bacteria isolated from the foot pad of *Spheniscus magellanicus* with and without bumblefoot. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.65, p.47-54, 2013.
- PAGANO, L.P. Voriconazole or ambisome in neutropenia. In: CONFERENCE ADVANCES AGAINST ASPERGILLOSIS, 4., 2010 *Proceedings...* Rome: AAA, 2010.
- REFERENCE method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. M38-A2. Approved standard. 2.ed. Wayne: [CLSI], 2008. v.22, n.16.
- SCIENTIFIC Opinion on the use of oregano and lemon balm extracts as a food additive. *EFSA J.*, v.8, p.1-19, 2010.
- SILVA, J.P.L.; DUARTE-ALMEIDA, J.M.; PEREZ, D.V. *et al.* Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.30, p.136-141, 2010.
- SOLIMAN, F.M.; YOUSIF, M.F.; ZAGHLOUL, S.S. *et al.* Seasonal variation in the essential oil composition of *Origanum majorana* L. cultivated in Egypt. *Z. Naturforsch. C*, v.64, p.611-6144, 2009.
- TARTOR, Y.H.; HASSAN, F.A.M. Assessment of carvacrol for control of avian aspergillosis in intratracheally challenged chickens in comparison to voriconazole with a reference on economic impact. *J. Appl. Microbiol.*, v.123, p.1-12, 2017.
- TISSERAND, R.; YOUNG, R. *Essential oil safety*. Churchill Livingstone: Elsevier, 2014. 784p.
- ZANANDREA, I.; JULIANO D.S.; ANDRÉA, B.M. *et al.* Atividade do óleo essencial de orégano contra fungos patogênicos do arroz: crescimentos micelial em placas. *Rev. Bras. Farmacognosia*, v.14, p.14-16, 2004.