

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

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA
FAMÍLIA LAMIACEAE**

ROSEMA SANTIN

PORTO ALEGRE

2013

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

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO E TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA
FAMÍLIA LAMIACEAE**

Autor: Rosema Santin

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias, área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal e especialidade Farmacologia e Terapêutica

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Co-orientadora: Marlete Brum Cleff

PORTO ALEGRE

2013

CIP - Catalogação na Publicação

Santin, Rosema

Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da Família Lamiaceae / Rosema Santin. -- 2013.

104 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.

Coorientadora: Marlete Brum Cleff.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2013.

1. Origanum vulgare. 2. Origanum majorana. 3. Rosmarinus officinalis. 4. irritação. 5. corrosão. I. Mello, João Roberto Braga de, orient. II. Cleff, Marlete Brum, coorient. III. Título.

Rosema Santin

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA
FAMÍLIA LAMIACEAE

Aprovada em 08 MAR 2013

APROVADO POR:

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

Prof. Dr. Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

Prof. Dr. Márcia de Oliveira Nobre
Membro da Comissão

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles
Membro da Comissão

*A minha família,
Roque, Rosa, Roberto e Eduardo,
por todo amor, carinho,
compreensão e incentivo...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, pelas oportunidades e conquistas, pela saúde, pelos obstáculos que ficaram.....enfim, pela força para chegar até aqui...

Aos meus pais, Rosa e Roque....Obrigada pela vida, pelo amor, carinho, apoio, compreensão a mim dedicados. Ao meu irmão e amigo Roberto pelo apoio e amizade. Ao meu noivo Eduardo, pelo amor, carinho, paciência, compreensão, apoio, amizade, estímulo indispensável em todos os momentos e por fazer parte da minha vida. Muito obrigada por tudo, amo vocês!!!

Ao meu orientador Prof^o João Roberto Braga de Mello pelos ensinamentos, oportunidades e confiança fundamentais na realização deste projeto. À Prof^a Fernanda pelos ensinamentos, apoio e auxílio na realização dos experimentos e amizade.

À amiga e co-orientadora Prof^a Marlete Brum Cleff pelas horas dedicadas a esta tese, pela paciência, compreensão, apoio, amizade a mim dedicados.

As minhas amigas Antonella, Isabel, Claudia e Caroline. Gurias, muito obrigada por tudo, pelas horas de conversa, distração, trabalho, amizade, apoio....vários finais de semana e feriados no campus, valeu a pena!! Com certeza sem vocês isso tudo não seria possível. A minha amiga Elizabeth pela amizade, ensinamentos e pelo auxílio nas análises dos resultados.

Aos amigos professores, alunos e funcionários do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MicVet), em especial ao Prof^o Mário Meireles, pelos ensinamentos, amizade, paciência e apoio no desenvolvimento deste trabalho. Ao pessoal do Grupo de pesquisa, ensino e extensão em Produtos Naturais na Clínica Médica Veterinária (FITOPEET) pela amizade, aprendizado, força, auxílio, compreensão e apoio.

Ao Laboratório de Oleoquímica e Biodiesel da UFPel pela extração e realização das análises químicas, em especial ao Prof^o Rogério Freitag e a Gabriela Alves pela amizade e apoio.

A todo pessoal do Laboratório do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da UFRGS pelo auxílio no desenvolvimento do experimento, em especial às estagiárias e bolsistas de iniciação científica Itatiele, Rafaela, Luciana e Patrícia.

Ao Núcleo de Reabilitação da Fauna Silvestre (NUFRS) da UFPel pelo apoio durante a realização do experimento.

A BIOENSAIOS, especialmente à Médica Veterinária Maria Lúcia pelos ensinamentos, compreensão, auxílio e amizade. Ao Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Mapa), em especial à Médica Veterinária Ana Ondina pela disponibilidade e apoio durante o experimento.

À CAPES pela bolsa de estudos e, aos demais órgãos financiadores, CNPq e FAPERGS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

Aos animais, em especial a Pedrita, pois eles são o nosso estímulo ao aprendizado.

**“Mude, mas comece devagar, por que a direção é mais importante que a
velocidade.”**

Clarice Lispector

RESUMO

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E TOXICIDADE DE ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA LAMIACEAE

Autor: Rosema Santin

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Plantas medicinais e óleos essenciais representam um importante papel na terapêutica, tanto na cura como também na prevenção de diferentes enfermidades, sendo esta prática medicinal uma das mais antigas formas de tratamento. Devido à utilização dos óleos essenciais na terapêutica e a importância do conhecimento do potencial de toxicidade destes, objetivou-se: (i) identificar os principais componentes químicos dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum majorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim); (ii) avaliar a atividade antifúngica *in vitro* destes óleos essenciais frente a leveduras isoladas de animais hígidos e casos clínicos; (iii) avaliar a irritação/corrosão cutânea e ocular aguda dos três óleos essenciais e (iv) avaliar a sensibilização cutânea do óleo essencial de orégano. O material vegetal foi adquirido de distribuidor comercial e encaminhado para extração do óleo essencial por hidrodestilação em Clevenger e, para análise cromatográfica através da cromatografia gasosa. Para realização dos testes *in vitro* foi utilizado o método de microdiluição em caldo, documento M27A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) com adaptações para fitofármacos e *Malassezia pachydermatis*. Os óleos essenciais de orégano, manjerona e alecrim foram testados nas concentrações de 28 a 0,87mg/mL, 60 a 1,87mg/mL e 112,8 a 3,52mg/mL, respectivamente. Os testes de toxicidade *in vivo* foram realizados conforme a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Para os testes de irritação/corrosão cutânea (OECD 404, 2002) e ocular aguda (OECD 405, 2002) foram utilizados 24 coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), Nova Zelândia, machos, adultos e hígidos. Na sensibilização cutânea (OECD 406, 1992) utilizaram-se 33 cobaias (*Cavia porcellus*), fêmeas, adultas e híginas. Os compostos majoritários do orégano foram timol, α -terpineno e 4-terpineol; da manjerona timol, 4-terpineol e p-cimeno e; do alecrim α -pineno e 1,8 cineol. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de orégano para *M. pachydermatis* variaram de $\leq 0,87$ a 7mg/mL. Para manjerona a CIM e a CFM foram de $\leq 1,87$ a 30mg/mL e de $\leq 3,52$ a 112,8mg/mL para o

alecrim nos isolados de *M. pachydermatis*, *Candida* spp e *T. asahii*. Nas avaliações da irritação/corrosão cutânea do óleo essencial de orégano 3% somente um animal apresentou eritema leve nas 24h com regressão aos sete dias e, edema leve nas 72h com regressão aos sete dias. Na irritação/corrosão ocular, apenas um animal apresentou reação inflamatória nas avaliações de 24 e 48h, regredindo nas 72h. Na sensibilização cutânea, os animais responderam à indução, mas nenhum respondeu ao desafio. Nos animais tratados com óleo essencial de manjerona 6% nas 24, 48 e 72h apresentaram eritema leve, regredindo em até sete dias. Dois animais apresentaram edema leve nas 24 e 48h com remissão nas 72h e um animal permaneceu sem alterações. Em dois animais do grupo alecrim 24% as lesões de eritema/escara regrediram em 21 dias. Quanto ao edema, as lesões foram consideradas reversíveis aos sete dias. Conclui-se que *M. pachydermatis* é sensível ao óleo essencial de orégano; que os óleos essenciais de manjerona e alecrim possuem atividade antifúngica *in vitro* frente a isolados de animais; o óleo essencial de orégano 3% causa irritação cutânea e ocular aguda leve e, não causa sensibilização cutânea na concentração testada. O óleo essencial de manjerona 6% causa irritação cutânea e ocular aguda leve e, o óleo essencial de alecrim 24% causa irritação cutânea e ocular aguda moderada.

Palavras-chave: *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis*, plantas medicinais, irritação, corrosão, sensibilização

ABSTRACT

ANTIFUNGAL POTENTIAL TOXICITY OF ESSENTIAL OILS AND FAMILY LAMIACEAE

Medicinal plants and essential oils represent an important therapeutic role in the cure and diseases different prevention both, this medical practice is one the oldest treatment forms. Thus, the aim was: (i) identify the main chemical components of essential oils from *Origanum vulgare* (oregano), *Origanum majorana* (marjoram) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary), (ii) evaluate the *in vitro* antifungal activity of essential oils against yeasts isolated from healthy animals and clinical cases, (iii) evaluate the irritation/skin corrosion and acute eye of the three essential oils and (iv) assess the skin sensitization of the oregano essential oil. The plant material was purchased from commercial distributor and referred for essential oil extraction and gas chromatography. We used the method of microdilution M27-A3 with adaptations for phytochemicals and *Malassezia pachydermatis*. The oregano essential oils, marjoram and rosemary were tested at concentrations from 28 to 0.87 mg/mL, 60 to 1.87 mg/mL and 112.8 to 3.52 mg/mL, respectively. The *in vivo* toxicity tests were performed according to the Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). The twenty-four males, adults and healthy rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) were used for irritation/corrosion skin (OECD 404, 2002) and eye acute (OECD 405, 2002) tests. The thirty-three adults, females and healthy guinea pigs (*Cavia porcellus*) were used for sensitization skin test (OECD 406, 1992). The major compounds in oregano were thymol, α -terpinene and 4-terpineol, in marjoram were thymol, 4-terpineol, and p-cymene and in rosemary were α -pinene and 1,8 cineole. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of the oregano essential oil against to *M. pachydermatis* were ≤ 0.87 to 7mg/mL, while the MIC and MFC of the marjoram were ≤ 1.87 to 30mg/mL. The MIC and CFM of the rosemary were ≤ 3.52 to 112.8 mg/mL against to *M. pachydermatis*, *Candida* spp and *T. asahii*. In the irritation/skin corrosion test, only one animal at 24h had slight erythema with regression at 7 days and slight edema at 72 h with regression to 7 days against to oregano essential oil at 3%. In the eye irritation/corrosion test, only one animal showed inflammatory reaction signs at 24 and 48h evaluates, but the assessments 72h had regressed. In the skin sensitization test, the animals responded, but anyone responded to

the challenge. The treated with marjoram essential oils at 6%, the animals showed slight erythema at 24, 48 and 72h evaluate, with regression to 7 days. About to edema presentation, two animals showed moderate at 24 and 48h, with regression at 72h, only one animal without signs. The group rosemary at 24%, the erythema/eschar lesions in two animals were regression at 21 days. About the edema, the lesions were reversible for seven days. The conclusion was the sensibility of *M. pachydermatis* against to oregano essential oil, antifungal activity in vitro of marjoram and rosemary essential oils against animals isolates, the oregano essential oil at 3% induces skin and eye irritation slight acute and doesn't induce skin sensitization. The marjoram essential oil at 6% induces skin and eye irritation slight acute, the rosemary essential oil at 24% induces skin and eye irritation moderate acute.

Keywords: *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Rosmarinus officinalis*, medicinal plants, irritation, corrosion, sensitization

LISTA DE FIGURAS

Artigo 1

- Figura 1 - Padrões utilizados e os picos dos constituintes encontrados na cromatografia gasosa da amostra de *Origanum vulgare*, sendo: 1- α -pineno; 2- canfeno; 3- β -pineno; 4- mirceno; 5- α -terpineno; 6- p-cimeno, 7- Limoneno, 8- 1,8-cineol, 9- terpinoleno, 10- linalol, 11- 4-terpineol, 12- α -terpineol, 13- timol e 14- carvacrol..... 36
- Figura 2 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de orégano frente a diferentes isolados clínicos de *M. pachydermatis* provenientes de otite e dermatite em cães..... 36

Artigo 2

- Figura 1 - Padrões utilizados e os picos dos constituintes encontrados na cromatografia gasosa da amostra de *Origanum majorana*, sendo: 1- α -pineno; 2- canfeno; 3- β -pineno; 4- mirceno; 5- α -terpineno; 6- p-cimeno, 7- Limoneno, 8- 1,8-cineol, 9- terpinoleno, 10- linalol, 11- 4-terpineol, 12- α -terpineol, 13- timol e 14- carvacrol..... 49
- Figura 2 - Padrões utilizados e os picos dos constituintes encontrados na cromatografia gasosa da amostra de *Rosmarinus officinalis*, sendo: 1- α -pineno; 2- canfeno; 3- β -pineno; 4- mirceno; 5- α -terpineno; 6- p-cimeno, 7- Limoneno, 8- 1,8-cineol, 9- terpinoleno, 10- linalol, 11- 4-terpineol, 12- α -terpineol, 13- timol e 14- carvacrol..... 50

LISTA DE TABELAS

Artigo 1

- Tabela 1 - CIM do óleo essencial de orégano avaliando a sensibilidade de *M. pachydermatis* isoladas de cães com otite externa e dermatite através do método de microdiluição em caldo..... 37

Artigo 2

- Tabela 1 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de manjerona e alecrim sobre isolados de *M.pachydermatis*, *Candida* spp e *T. asahii*..... 51
- Tabela 2 - Valores de CIM₅₀ e CFM₅₀ e CIM₉₀ e CFM₉₀ dos óleos essenciais de manjerona e alecrim frente a isolados de *M. pachydermatis*, *Candida* spp e *T. asahii*..... 53

Artigo 3

- Tabela 1 - Escores utilizados na avaliação quanto à formação de eritema/escara e edema nos diferentes períodos de avaliação, conforme OECD 404 (2002)..... 66
- Tabela 2 - Graduação em escores das lesões na córnea, íris, conjuntiva e pálpebras segundo OECD 405 (2002)..... 67
- Tabela 3 - Teste de irritação/corrosão cutânea aguda do óleo essencial de orégano em coelhos albinos, classificação em escores segundo a OECD 404 (2002)..... 69
- Tabela 4 - Teste de sensibilização cutânea do óleo essencial de orégano em cobaias segundo OECD 406, escores conforme Magnusson e Kligman e média e erro padrão da média dos pesos no início e ao final do experimento..... 70

Artigo 4

Tabela 1 - Classificação dos escores quanto à formação de eritema/escara conforme OECD 404 (2002).....	81
Tabela 2 - Graduação em escores das lesões na córnea, íris, conjuntiva e pálpebras segundo OECD 405 (2002).....	83
Tabela 3 - Escores obtidos nos diferentes tempos de avaliação no teste de irritação/corrosão cutânea aguda do óleo essencial de manjerona 6% segundo OECD 404 (2002).....	84
Tabela 4 - Escores obtidos nos diferentes tempos de avaliação no teste de irritação/corrosão cutânea aguda do óleo essencial de alecrim 24% segundo OECD 404 (2002).....	85
Tabela 5 - Escores de acordo com os tempos de avaliação, após o ensaio de irritação/corrosão ocular em coelhos albinos tratados com formulação contendo óleo essencial de manjerona 6%, conforme OECD 405 (2002).....	86
Tabela 6 - Escores de acordo com os tempos de avaliação, após o ensaio de irritação/corrosão ocular em coelhos albinos tratados com formulação contendo óleo essencial de alecrim 24%, conforme OECD 405 (2002).....	87

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	15
2 OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
3.1 Plantas Medicinais e óleos essenciais.....	18
3.2 <i>Origanum vulgare</i> L.....	20
3.3 <i>Origanum majorana</i> L.....	22
3.4 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	24
3.5 Critérios para utilização de plantas medicinais e fitoterápicos.....	27
4 ARTIGOS	
4.1 Artigo 1- Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> frente a <i>Malassezia pachydermatis</i>	30
4.2 Artigo 2 – Sensibilidade de leveduras aos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	42
4.3 Artigo 3 – Avaliação da irritação cutânea e ocular aguda e sensibilização cutânea do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i>	60
4.4 Artigo 4 – Irritação/corrosão cutânea e ocular dos óleos essenciais de <i>Origanum majorana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i>	76
5 CONCLUSÕES.....	94
REFERÊNCIAS.....	95

1 INTRODUÇÃO

A utilização terapêutica de extratos vegetais ou princípios ativos deles extraídos é chamada de fitoterapia. Esta forma terapêutica vem desde os primórdios da humanidade, mas não se sabe ao certo quando realmente iniciou (CASTRO; CHEMALE, 1995; MARTINS et al., 2000). A descoberta das propriedades curativas das plantas, provavelmente ocorreu por intuição e/ou observação dos animais doentes que buscavam o alívio de suas enfermidades no consumo de plantas. Apesar de vários estudos com relação às propriedades terapêuticas das plantas, Simões et al. (2003) observaram que apenas 15 a 17% destas já foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal.

Segundo a OMS (Organização Mundial de Saúde), cerca de 75% da população mundial, principalmente nos países em desenvolvimento, utilizam plantas medicinais no tratamento de doenças. Porém, estudos demonstram que a maioria dos fitoterápicos utilizados através da automedicação ou por prescrição médica não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA JUNIOR, 2008).

Em 2011, o Comitê Técnico Temático de Apoio a Políticas de Plantas Medicinais e Fitoterápicos foi instituído para apoiar a implementação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos no Brasil e, foi elaborado o Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, que serve como suporte às práticas de manipulação e disposição de fitoterápicos nos Programas de Fitoterapia, principalmente no Sistema Único de Saúde (SUS). Com isso, é garantido aos usuários do SUS, fitoterápicos eficazes e seguros, segundo a legislação vigente (BRASIL, 2011).

Nas últimas décadas, a resistência de alguns microrganismos aos fármacos convencionais, aliado a busca por terapias menos tóxicas e por medicamentos com menores efeitos adversos e o menor custo tornam a fitoterapia cada vez mais popular em veterinária, estimulando assim, a avaliação de diferentes extratos de plantas, principalmente quanto a sua atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e quimioterápica (BUFFON et al., 2001; CLEFF; SANTIN, 2009; GALUPPI et al., 2010).

Em micologia médica as leveduras do gênero *Candida* são causadoras de micoses principalmente em indivíduos imunocomprometidos (FARAH; ASHMAN; CHALLACOMBE, 2000; LACAZ et al., 2002), sendo que na clínica de pequenos animais a incidência das micoses e de leveduroses, como a candidíase, é cada vez mais

elevada (CLEFF et al., 2007). Já a *Malassezia pachydermatis* é uma levedura pertencente à microbiota da pele, mucosas e meato acústico de diferentes espécies animais. Porém, quando há uma queda no equilíbrio parasita-hospedeiro ocorre o aumento do número de células e a passagem da levedura da forma comensal para a parasitária ou patogênica, sendo as otites e dermatites as principais formas clínicas desta micose que é diagnosticada com frequência na clínica de pequenos animais (NOBRE et al., 1998; MACHADO et al., 2003; NASCENTE et al., 2004).

Com relação ao tratamento, com fitoterápicos de infecções em animais causadas por leveduras e até mesmo por bactérias ainda são escassos. Por sua vez, a busca por melhor qualidade de vida e, o crescente número de animais de estimação vem estimulando o estudo destas plantas com potencial terapêutico, visto que em humanos esta linha de pesquisa vem sendo bem desenvolvida (GALUPPI et al., 2010). Assim, a determinação do potencial tóxico dos extratos vegetais a serem utilizados em um estudo, se torna de suma importância, pois a possibilidade de toxicidade pode ser um limitante para a aplicação prática dos fitoterápicos (MELO et al., 2001).

Assim, os vegetais da família Lamiaceae, com destaque para o *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, têm despertado interesse, visto que possuem propriedades antimicrobianas, além de, permitir a extração de óleos essenciais (BUSATTA, 2006, ALVES et al., 2006; CLEFF et al., 2008; CLEFF et al., 2010a). Contudo, ainda são escassos estudos avaliando o potencial tóxico de diferentes espécies vegetais, sendo necessário ampliar e aprofundar estas investigações, com relação ao uso das plantas medicinais.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar o efeito antifúngico *in vitro* e a toxicidade *in vivo* dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar os principais componentes químicos dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* utilizados no estudo;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* frente a leveduras isoladas de animais hígidos e de casos clínicos;
- Avaliar a irritação/corrosão cutânea aguda dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*);
- Avaliar a irritação/corrosão ocular aguda dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis* em coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*);
- Avaliar a sensibilização cutânea do óleo essencial de *O. vulgare* em cobaias (*Cavia porcellus*).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Plantas Medicinais e óleos essenciais

A utilização de plantas com fins medicinais para tratamento, cura e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas da prática medicinal (YUNES; CALIXTO, 2001). O homem primitivo, ao procurar plantas e alimento para seu sustento, foi descobrindo espécies com ação medicinal ou tóxica, dando início a uma sistematização empírica, de acordo com o uso que podia fazer deles. Indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas foram encontrados nas mais antigas civilizações, fazendo com que as plantas adquirissem fundamental importância na medicina popular (SIMÕES et al., 2003).

O Brasil possui uma ampla biodiversidade onde são encontradas inúmeras espécies vegetais. Atualmente, a maioria dos medicamentos é ou foi originado de estudos a partir da cultura popular, isto por sua vez, faz com que esta rica biodiversidade seja um vasto campo para a pesquisa científica (BRASIL, 2011).

A busca por novas substâncias com ação antimicrobiana, com efeitos indesejáveis mínimos, eficácia e segurança vem ascendendo dentro da comunidade científica (LORENZI; MATOS, 2002; CLEFF et al., 2010a; GALUPPI et al., 2010). Isto reflete principalmente no resgate do uso de plantas medicinais, bem como de seus respectivos metabólitos secundários isolados (CIMANGA et al., 2002; DUARTE et al., 2005; MOREIRA et al., 2010).

Como alternativa dentro deste contexto, os óleos essenciais merecem destaque, pois são metabólitos secundários e possuem comprovada atividade biológica, entre elas antibacteriana, antifúngica e antiviral (BARATTA et al., 1998; CLEFF et al., 2010b; NOSTRO et al., 2004; SANTURIO et al., 2007; SAEED; TARIQ, 2009), podendo ser utilizados em diversas enfermidades (BARATTA et al., 1998; DORMAN et al., 2000; SOUZA et al., 2005; KHAN et al., 2011). Estas atividades, possivelmente estão associadas à presença de constituintes, como os monoterpenos e os sesquiterpenos que estão diretamente relacionados à ação antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001; BUSATTA et al., 2006). Além disso, os óleos essenciais apresentam baixo risco de desenvolvimento de resistência microbiana *in vitro* (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2003; NOSTRO et al., 2004).

Os óleos essenciais são, de maneira geral, uma mistura líquida muito complexa de substâncias voláteis, lipofílicas e geralmente, apresentam-se aromáticos. Embora

todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização geográfica e, ainda pode variar significativamente, de acordo com a época de coleta, condições climáticas e de solo, mesmo quando o óleo essencial é extraído de um mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal (SIMÕES et al., 2003).

A extração dos óleos essenciais das plantas, sua preparação e a concentração de suas frações ou compostos são de grande importância. Assim, a escolha do método de extração é fundamental, variando conforme a localização do óleo essencial na planta e com a finalidade do mesmo. O método clássico, usado industrialmente, é a destilação por arraste de vapor de água. Embora esta técnica seja largamente empregada, tem como desvantagem a formação de substâncias indesejáveis, principalmente devido à alta temperatura da operação (SIMÕES et al., 2003).

Grande variedade de plantas tem sido estudadas em diferentes concentrações e formas de preparo (extrato aquoso, etanólico, hidroalcoólico, tinturas, óleos essenciais entre outras) quanto sua atividade antimicrobiana, antioxidante, anticarcinogênica, antiparasitária, anti-inflamatória entre outras (BARATTA et al., 1998; DORMAN et al. 2000; NERY et al., 2009; CLEFF et al., 2010a; CLEFF et al., 2012). Estes estudos se concentram na área de alimentos e na medicina humana, sendo uma área em vasta expansão na comunidade científica (KLEIN et al. 2009; SOUZA et al., 2005). Entretanto, avaliações científicas utilizando isolados de casos clínicos e provenientes de animais ainda são escassos (CLEFF et al., 2008; CLEFF et al., 2010a; CLEFF et al., 2010b).

Plantas medicinais, assim como os medicamentos sintéticos, possuem grupos de compostos farmacologicamente ativos que atuam nos organismos vivos. O emprego terapêutico dessas plantas exige o conhecimento prévio de seus compostos para a avaliação das potencialidades terapêuticas. Sua toxicidade também é de grande importância, para conseguir uma formulação apropriada e uma estratégia adequada para seu uso (SOUZA et al., 2005; CARVALHO et al., 2007; MELO et al., 2001).

Apesar do crescente interesse em utilizar os óleos essenciais com finalidade terapêutica ainda são poucos estudos que disponibilizam informações referentes à toxicidade que estes fitofármacos podem desencadear na saúde humana e animal. Neste contexto, grande parte dos fitoterápicos atualmente utilizados não tem o seu perfil tóxico bem conhecido (CAPASSO et al., 2000; VEIGA JUNIOR, 2008).

Quantidades excessivas de determinadas plantas, uso ou preparo inadequado e, principalmente a utilização de plantas com efeitos desconhecidos, são as principais formas de intoxicações. É importante ressaltar que as formas de preparo dos extratos, influenciam na eficácia e segurança em cada tipo de extrato vegetal a ser utilizado (MARTINS et al., 2000).

Dentre as plantas utilizadas empiricamente pela população e que, há tempos vêm despertando interesse da comunidade científica internacional, embora sem comprovações quanto risco de toxicidade e dosagem segura, destacam-se os vegetais da família Lamiaceae, como *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*.

3.2 *Origanum vulgare* L.

O. vulgare, também conhecido popularmente como orégano, é uma planta originária da região mediterrânea que pertence à família *Lamiaceae* e, apresenta em torno de 38 espécies, caracterizadas por uma grande diversidade morfológica e química, sendo as mais conhecidas e utilizadas o *O. vulgare* L., *O. hirtum* (orégano grego), *O. onites* L. (orégano turco), *Coridothymus capitatus* L. (orégano espanhol) e *Lippia graveolens* (orégano mexicano) (ARCILA-LOZANO et al., 2004). Possui capacidade de produzir óleo essencial com aroma característico e rico em fenóis, principalmente carvacrol e timol (SIMÕES et al., 2003).

O. vulgare é amplamente utilizado na culinária e na medicina popular e, atualmente tem sido avaliado quanto ao efeito terapêutico em diversas enfermidades. Seu óleo essencial apresenta alta estabilidade, ausência de contaminação microbiológica e diversidade de componentes químicos que têm sido muito explorados devido ao potencial antimicrobiano (LAMBERT et al., 2001; MANOHAR et al. 2001; SOUZA et al. 2005).

A atividade antibacteriana do orégano já foi descrita, sendo que no estudo sobre o potencial antibacteriano da infusão, decocção e óleo essencial de orégano (*O. vulgare*) frente a 111 bactérias gram-positivas de três gêneros e 23 espécies foi demonstrada atividade da infusão e do óleo essencial, porém todos microrganismos testados foram resistentes à decocção (SAEED; TARIQ, 2009).

Santurio et al. (2007) estudaram a suscetibilidade ao óleo essencial de orégano de 20 sorovares de *Salmonella enterica* ressaltando, apesar da larga faixa de variação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) e da CBM (Concentração Bactericida Mínima),

a elevada atividade antimicrobiana e bactericida deste óleo. Em vista disso, o orégano pode vir a ser uma importante fonte viável de antimicrobianos principalmente para utilização em sistemas de conservação de alimentos (SOUZA et al., 2005).

No estudo *in vitro*, realizado por Cleff et al. (2008a), foi comprovada a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano frente ao *Sporothrix schenckii* através da técnica de microdiluição em caldo adaptada para um fitofármaco. Também foi demonstrada a atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes químicos frente a espécies de leveduras como *Candida* e *Cryptococcus neoformans* (MANOHAR et al., 2001; CHAMI et al., 2004; CLEFF et al., 2010b). A suscetibilidade de *Malassezia pachydermatis* a este óleo também já foi descrita, sendo observadas CIM e CFM entre 0,015 a 0,001% (CLEFF et al., 2010b). Prestes et al., 2008; Rusenova e Parvanov, 2009 observaram atividade antifúngica do óleo essencial de orégano nas concentrações entre 0,06% e 0,25%. E, segundo Galuppi et al. (2010), o óleo essencial de orégano está entre os mais eficientes quando comparados aos 23 óleos testados frente a diferentes espécies de *Malassezia*.

Helal e Stelato (2009) demonstraram que o óleo essencial de orégano de diferentes marcas tiveram ação frente às leveduras *Candida albicans* e *Candida krusei*, porém, a maioria não teve ação para *Candida parapsilosis* nas concentrações testadas. Neste mesmo estudo, foi observada diferença na atividade antifúngica do óleo de acordo com a marca e o lote das amostras testadas. Essa variação pode ser devido à composição química, bem como, por vários fatores como clima, sazonalidade, áreas geográficas, assim como pelas condições de cultivo, estágio de desenvolvimento, período de colheita do vegetal e técnica de obtenção do produto derivado, os quais podem interferir nas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2003).

O óleo essencial de *O. vulgare* com CIM de 80µL/mL foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos fungos, incluindo *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporium gypseum*, *M. canis*, *Cladosporium herbarium*, *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus* com halos de inibição variando de 9 a 27mm de diâmetro. Nesta pesquisa também foi possível observar a capacidade deste óleo de inibir o crescimento das cepas fúngicas, mesmo sendo estas resistentes aos antifúngicos padrões utilizados, como a nistatina e o cetoconazol (SOUZA, 2010).

Quanto à toxicidade celular, Sivropoulou et al. (1996) demonstraram que o óleo essencial de *O. vulgare* ssp. *hirtum* apresentou níveis elevados em quatro linhagens

celulares, duas derivadas de tumores humanos (carcinoma epitelial de colo do útero e carcinoma epidermóide de laringe humana), uma de rim de macaco africano e uma pele de coelho.

Estudos com relação à toxicidade do óleo essencial de orégano são escassos, entretanto, Cleff et al. (2008b) estudaram a toxicidade pré-clínica do óleo essencial de orégano a 3% administrado diariamente por 30 dias em ratas Wistar, por via oral e intra-vaginal. Os resultados não evidenciaram qualquer alteração macroscópica no trato reprodutivo e digestório, fígado, baço e rins, assim como não foram observadas alterações nas avaliações clínicas, hematológicas e histopatológicas.

O uso do *O. vulgare* com ausência de efeitos adversos também foi demonstrado em outros estudos com animais domésticos (GIANNENAS et al., 2003; CHAMI et al., 2004). Estudo da ação de compostos isolados avaliou a ação de eugenol e carvacrol em ratos, demonstrando que estas substâncias não causaram efeitos colaterais ou tóxicos nos animais experimentais (CHAMI et al., 2004).

Estudos clínicos indicam que o orégano apresenta alergenicidade e, é recomendado evitar o consumo excessivo durante a gravidez devido às propriedades sedativas e abortivas (ARCILA-LOZANO et al., 2004). Quando o extrato aquoso de *O. vulgare* a 20% foi utilizado em fêmeas prenhes houve 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 (BENAVIDES et al., 2000).

3.3 *Origanum majorana* L.

A manjerona tem como nome científico *Origanum majorana* ou *Majorana hortensis Moench*, e apresenta-se como uma planta perene, com uma porção subterrânea formada por raízes fibrosas. O caule é muito ramificado de coloração avermelhada, alcançando entre 30 a 60cm. As folhas são ovais, inteiras, pecioladas de coloração verde acinzentada. As flores são pequenas em espigas oblongas, de cor branca a rosada (KEN, 1951), popularmente conhecida como manjerona-inglesa, ouregão-vulgar, flor-do-himeneu, manjerona-doce, manjerona-verdadeira, manjerona-branca. É uma planta aromática que pertence à família Lamiaceae, rica na produção de óleos essenciais, sendo de origem Mediterrânea e Oriente Médio (SIMÕES et al., 2003).

As plantas da família Lamiaceae, por serem ricas em óleos essenciais, caracterizam-se pela alta quantidade de compostos fenólicos, os quais acredita-se serem responsáveis por suas propriedades antimicrobianas (FERRARA et al., 2003).

No óleo essencial de manjerona tem sido descrita a presença de mircenol, γ -terpinene, α -terpineno, p-cimeno, borneol, timol, carvacrol, β -cariofileno, limoneno, α -pineno, β -pineno linalol e sabineno (BURT; REINDERS, 2004), sendo o timol e o carvacrol conhecidos como componentes majoritários destes óleos essenciais (LAMBERT et al., 2001; MARINO et al., 2001). Estes compostos são capazes de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática do microrganismo, provavelmente causando uma destruição na estrutura física da membrana (ULTEE; SMID, 2001).

Alguns estudos referem interessante ação antimicrobiana de espécies de *Origanum*, de modo que *O. vulgare* L. (orégano) e *O. majorana* L. (manjerona) têm demonstrado resultados importantes na inibição do crescimento de bactérias, fungos e síntese de metabólitos microbianos (MARINO et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2009). No estudo conduzido por Oliveira et al. (2009), os óleos essenciais de orégano e manjerona apresentaram efeito inibitório significativo ($p < 0,05$) sobre cepas de *S. aureus*, *S. coagulase negativa* e *Enterobacter* spp, sendo que a CIM variou de 5-20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e 2,5-10 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o óleo essencial de orégano e manjerona, respectivamente. O óleo essencial de manjerona apresentou efeito inibitório mais intenso sobre o crescimento de todas as cepas bacterianas testadas quando comparado ao óleo essencial de orégano.

No trabalho de Busatta et al. (2008), utilizando teste *in vitro* de difusão em disco, foi encontrada CIM para o óleo essencial de *O. majorana* frente a cepas de *E. coli* e *Salmonella choleraesuis* de 0,92 mg/mL e 0,78 mg/mL para *S. aureus*. Os autores também observaram que todos os microrganismos testados foram suscetíveis à ação do óleo essencial de manjerona, com valores de CIM entre 0,069 e 2,3 mg/mL.

As propriedades antibacterianas, antifúngicas e antioxidantes de óleos comerciais de oito plantas, entre elas *O. majorana* foram avaliadas por Baratta et al. (1998). Este óleo apresentou a mais alta atividade antioxidante, sendo que em ensaios com gema de ovo, a atividade antioxidante da manjerona foi muito mais alta do que a do α -tocoferol em todas as concentrações testadas. Quanto à atividade antibacteriana, os autores também testaram cerca de 25 bactérias, Gram positivas e Gram negativas, sendo que o óleo da manjerona apresentou um dos três melhores resultados como inibidores

do crescimento destes microrganismos, além da capacidade de inibição do *Aspergillus niger*.

A atividade antifúngica do óleo essencial de manjerona também foi testada frente ao *Penicillium digitatum*, demonstrando completa inibição, inclusive em baixas concentrações (~250µg/mL) e, frente a diferentes espécies de *Candida*, *Aspergillus* e dermatófitos onde a CIM de 320µL/mL foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos microrganismos, com halos de inibição variando de 12 a 40mm de diâmetro (DIFERERA et al., 2000; SOUZA, 2010).

Com relação ao mecanismo de ação dos óleos essenciais, Souza (2010) sugere que os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana* atuem como inibidores da parede celular, contudo, outros mecanismos que são responsáveis pela expressiva ação antifúngica do óleo essencial da manjerona possam estar envolvidos. Lee et al. (2007) sugerem que o mecanismo de ação do eugenol como antifúngico deve-se ao fato deste se ligar à membrana dos microrganismos e, assim, danificá-la.

Outra linha de pesquisa desenvolvida com extratos vegetais de manjerona é com relação à capacidade genotóxica, onde El-Ashmawy et al. (2005) concluíram que os extratos alcoólico e aquoso e o óleo essencial de *O. majorana* desempenham papel importante para melhorar as funções hepáticas e renais e diminuir a genotoxicidade induzida pela toxicidade do chumbo.

Embora existam trabalhos com relação às propriedades antimicrobianas do óleo essencial de manjerona, ainda nota-se uma carência de estudos para comprovar cientificamente os efeitos deste óleo como antifúngico e, principalmente estudos toxicológicos em modelos experimentais.

3.4 *Rosmarinus officinalis* L.

O alecrim (*R. officinalis* L.), pertencente à família Lamiaceae, possui propriedades antissépticas para as vias aéreas, antidepressivo, calmante e como auxiliar nos problemas de memória, segundo a medicina popular. Em latim significa “orvalho do mar”, é também chamado popularmente de alecrim, alecrim-de-jardim, rosmarino, alecrinzeiro, alecrim comum, alecrim-de-cheiro, alecrim-de-horta, erva-coada, flor-do-olimpico e rosa-marinha e rosmarinho (LORENZI; MATOS, 2002). Esta espécie é produtora de óleo essencial que contém principalmente pinenos, canfeno, cineol, borneol, acetato de bornila, cânfora e diterpenos. Assim como, ácidos orgânicos,

saponinas, traços de alcalóides, princípios amargos e taninos, os quais podem ter efeito alelopático (SILVA et al., 2007).

Os efeitos terapêuticos do alecrim estão sendo comprovados em vários experimentos, sempre dando ênfase ao uso popular desta erva tão conhecida mundialmente, isto devido ao seu alto potencial fitoterápico e sua baixa toxicidade, assim sugerida em modelos experimentais (MARCHIORI, 2004).

As particularidades dos óleos vegetais em geral podem ser alteradas por variações genéticas intraespecíficas, bem como por fatores climáticos, solo, época e forma de plantio, adubação, material da planta (fresco ou seco), técnica de extração, fonte botânica, colheita dentre outros podendo influenciar na atividade antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001). Celiktas et al. (2007) relacionaram o aumento da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *R. officinalis* em amostras coletadas na primavera.

As propriedades terapêuticas do alecrim podem ser observadas nos casos de obstrução nasal, como antisséptico bucal, como cicatrizante e estimulante do couro cabeludo (LORENZI; MATOS, 2002). O óleo volátil é antibacteriano e antisséptico e possui capacidade de inibir o crescimento de várias bactérias e fungos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis, sendo que os compostos citral, geraniol, linalol e timol têm alto potencial antisséptico, superior ao do próprio fenol. No entanto, por suas propriedades antiespasmódicas e coleréticas, também presente nos compostos fenólicos, a infusão da planta é empregada no tratamento sintomático de problemas digestivos diversos (SIMÕES et al., 2003).

No estudo de Packer e Luz (2009) foi avaliada a ação antimicrobiana de diferentes óleos como copaíba, alecrim, melaleuca, alho e andiroba frente a cepas padrões de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans*. Os melhores resultados foram obtidos com os óleos de melaleuca e alecrim que apresentaram atividade bacteriostática e fungistática superior às demais amostras.

O efeito antibacteriano do extrato etanólico de alecrim frente ao *Clostridium perfringens* foi demonstrado através de teste *in vitro* de microdiluição em caldo por Lucarini et al. (2008). Os resultados de uma pesquisa *in vitro* avaliando o extrato de alecrim frente a microrganismos da cavidade oral sugerem a possibilidade de uso deste extrato como antimicrobiano oral. No entanto, os autores sugerem que são necessários modelos de estudo que possam reproduzir situações mais próximas àquelas encontradas na cavidade oral para melhor avaliação de agentes antimicrobianos no tratamento e prevenção de infecções orais biofilme-dependentes (SILVA et al., 2008).

Os extratos glicólicos de *R. officinalis* L. e *Syzygium cumini* L. apresentaram ação anti-candida para todas as cepas testadas, sendo que isolados de *C. tropicalis* demonstraram-se mais sensíveis aos extratos em relação a *C. albicans* e *C. glabrata* (COSTA et al., 2009). Os óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *R. officinalis* L. foram testados através do método de microdiluição em caldo frente a diferentes espécies de *Candida*. Todos os isolados apresentaram-se sensíveis aos óleos testados apesar das variações da CIM, porém o óleo essencial do *O. vulgare* apresentou melhores resultados, quando comparado ao *R. officinalis* (CLEFF et al., 2007).

Apesar dos resultados positivos em relação a inibição, alguns trabalhos relatam baixa atividade antifúngica do óleo essencial de *R. officinalis* L em espécies de *Candida* isoladas de humanos e do ambiente (ARAÚJO, 2003; LIMA et al., 2006).

Segundo alguns autores, o uso do alecrim deve ser controlado em gestantes e, sua essência pode ser irritante para a pele. Além de alterações no sono, a ingestão de doses elevadas provoca irritações gastrintestinais e nefrite, podendo causar hipersensibilidade (CARDOSO et al., 2000). O risco maior de *R. officinalis* está relacionado ao aumento da motilidade uterina causando aborto (VEIGA JUNIOR et al., 2005), embora Mengue et al. (2001) não consideram o alecrim e o orégano como potencialmente tóxicos na gestação.

Faria (2005) avaliou o óleo essencial de alecrim quanto aos aspectos comportamentais tóxicos e de letalidade em camundongos. Este mostrou-se seguro, sendo que até a dose de 5000mg/kg não levou os animais a óbito, não sendo possível a determinação da DL₅₀.

No estudo de Amin e Hamza (2005) foi avaliado o efeito hepatoprotetor de três extratos vegetais, *Hibiscus sabdariffa*, *Rosmarinus officinalis* e *Salvia officinalis* frente à ação hepatotóxica induzida pela azatioprina em ratos. Esta investigação demonstrou que todas as plantas testadas neste estudo restauraram os níveis de AST (aspartato aminotransferase) e ALT (alanina aminotransferase) ao normal e podem ser consideradas agentes protetores de toxicidade da azatioprina. Os animais que receberam somente os extratos testados não apresentaram nenhum sinal de hepatotoxicidade. Estes efeitos podem ser atribuídos à presença de altos percentuais de compostos antioxidantes no extrato aquoso de *R. officinalis*, pois já foi demonstrado que o extrato de alecrim e os seus compostos antioxidantes inibem peroxidação de lipídios e radicais livres *in vitro* (HARAGUCHI et al., 1995) e *in vivo* (FAHIM et al., 1999).

3.5 Critérios para utilização de plantas medicinais e fitoterápicos

As plantas, extratos e óleos essenciais com finalidades terapêuticas vêm sendo difundidos mundialmente, principalmente por suas propriedades antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes (BARATTA et al., 1998). As plantas apresentam inúmeros compostos bioativos que podem ser utilizados na formulação de fármacos (YUNES E CALIXTO, 2001). Porém, toda substância química deve ser considerada como um potencial agente tóxico, havendo assim, a necessidade de conhecer o tipo de efeito tóxico, e estabelecer as condições de uso seguro desses compostos visando à manutenção da sanidade animal e humana (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Apesar da riqueza vegetal de nosso país, somente alguns dados, de poucas plantas, estão disponíveis, incluindo plantas nativas e exóticas (SARTORATTO et al., 2004), sendo que para validar o uso de uma planta medicinal é necessária uma investigação sistemática sob vários aspectos, como químico, farmacológico e microbiológico que somados a outros resultarão no medicamento fitoterápico (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

Os fitoterápicos são uma classe de medicamentos largamente utilizados no país. Para que estes produtos sejam registrados e disponibilizados à população, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) avalia diversos critérios de qualidade, eficácia e segurança, exigindo requisitos muito semelhantes aos requeridos para os medicamentos convencionais. Este controle objetiva desvincular a ideia de que os fitoterápicos são produtos de qualidade inferior ou sem potencial de risco tóxico (CARVALHO et al., 2007).

O principal objetivo quando um fitoterápico é indicado, principalmente na medicina humana, é aumentar as opções terapêuticas dos profissionais de saúde ofertando medicamentos equivalentes, registrados, talvez com custos mais baixos, com espectros de ação maiores e, possivelmente, com indicações terapêuticas complementares às medicações existentes e efeitos adversos menores. Outro fator importante seria a valorização das tradições populares e o fornecimento de substrato para o desenvolvimento da indústria farmacêutica local (SIMÕES et al., 2003).

Para que esta validação ocorra, deve-se seguir a regulamentação federal vigente. Para tanto, existem protocolos os quais devem ser seguidos para comprovar cientificamente a segurança quando este produto for utilizado. Esses protocolos sofrem modificações conforme passar do tempo, sendo que hoje uma das mais citadas refere-se ao número de animais utilizados, originalmente nove e atualmente nos protocolos

oficiais variando de três a seis coelhos, a exemplo dos protocolos da *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD), da *Food and Drug Administration* (FDA) e do ministério da Saúde do Japão.

No Brasil, a regulamentação dos medicamentos fitoterápicos industrializados é realizada pela ANVISA, órgão federal do Sistema Nacional de Vigilância Sanitária, responsável pelo registro de medicamentos e outros produtos destinados à saúde (CARVALHO et al., 2007), que visa garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade.

Um critério obrigatório para o registro de fitoterápicos é a comprovação da sua segurança e eficácia. Para isso, de acordo com a RDC 48/04, as empresas poderão utilizar quatro alternativas: - Apresentação de estudos pré-clínicos e clínicos, para tanto, existe um guia para ensaios toxicológicos pré-clínicos específicos e a RE nº 90/04 estabelece os critérios mínimos aceitáveis para o estudo toxicológico agudo, subcrônico e crônico, e o estudo especial de genotoxicidade. Para os estudos clínicos, devem ser seguidas as determinações do Conselho Nacional de Saúde (CNS), através das Resoluções 196/96 e 251/97, além da RDC nº 39/2008; - Através da obtenção de pontuação definida a partir da apresentação de estudos farmacológicos e toxicológicos presentes nas obras contidas na “Lista de Referências bibliográficas para avaliação de segurança e eficácia de fitoterápicos”, publicada como RE 88/04; - Levantamento bibliográfico etnofarmacológico, mostrando eficácia e segurança do produto que tenha uso comprovado por um período igual ou superior a 20 anos. Nesse caso, é necessário apresentar comprovação de que o produto não é potencialmente tóxico, sendo solicitado pelo menos um teste de toxicologia pré-clínica e, ainda; - Existe uma lista de espécies vegetais de registro simplificado, publicada como IN nº 05/08, que contempla 36 espécies vegetais para as quais é dispensada a comprovação de eficácia e segurança, considerando a quantidade de estudos que já foi publicado sobre cada uma dessas espécies (BRASIL, 2004).

Diante do exposto e, considerando a importância dos medicamentos fitoterápicos nos dias atuais, há necessidade de caracterizar os padrões de toxicidade de óleos essenciais, principalmente pelo fato de tratar-se de uma mistura complexa de compostos apolares altamente lipossolúveis (CARVALHO et al., 2004). Além disso, ainda hoje, a grande maioria dos medicamentos tem origem em estudos desenvolvidos a partir da cultura popular (BRASIL, 2011).

Segundo Martins et al. (2000) os casos de intoxicações por plantas estão frequentemente relacionados ao uso de doses excessivas, preparo inadequado, bem como, o desconhecimento de compostos tóxicos presentes nestas. A falta de conhecimento sobre toxicidade denota um sério problema em saúde pública (VEIGA JUNIOR et al., 2005), visto que, toda substância química é um agente tóxico em potencial, dependendo apenas das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo, frequência e via de administração (CASTRO, 1993).

4.1 Artigo 1

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

Rosema Santin, Claudia Giordani, Isabel Martins Madrid, Caroline Bohnen Matos,
Rogério Antonio Freitag, Mário Carlos Araújo Meireles, Marlete Brum Cleff, João
Roberto Braga de Mello

**Artigo submetido à Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e
Zootecnia**

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

3

4 **Antifungal activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Malassezia***
5 ***pachydermatis***

6

7 Rosema Santin^{1*}, Claudia Giordani², Isabel Martins Madrid³, Caroline Bohnen Matos²,
8 Rogério Antonio Freitag⁴, Mário Carlos Araújo Meireles², Marlete Brum Cleff², João
9 Roberto Braga de Mello¹

10

11 ¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias – Universidade Federal do Rio
12 Grande do Sul – Porto Alegre, RS

13 ²Programa de Pós-Graduação em Veterinária – Universidade Federal de Pelotas –
14 Pelotas, RS

15 ³Dsc., M.V. Prefeitura Municipal de Pelotas – Pelotas, RS

16 ⁴Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção - Universidade Federal
17 de Pelotas – Pelotas, RS

18

19

20 Endereço: Rua Benjamin Furlan, 120 apto 401, Bairro São Miguel – Concórdia/SC –
21 CEP 89700-000

22 Telefone: (49) 88709339

23 Email: seminhavet@yahoo.com.br

24

25

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35 RESUMO

36 Objetivou-se com este estudo avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial
37 de *Origanum vulgare* frente a isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis*. As folhas
38 secas de *O. vulgare* foram adquiridas de distribuidor comercial com certificado de
39 qualidade e origem e encaminhadas para extração do óleo essencial e cromatografia.
40 Para realização do teste *in vitro* foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (CLSI
41 M27A3) com modificações para fitofármacos e *M. pachydermatis*. O óleo essencial de
42 orégano foi testado nas concentrações de 28 a 0,87mg/mL diluído em caldo Sabouraud
43 com 1% de tween 80. Todos os isolados foram testados em duplicata. Na análise
44 cromatográfica do óleo essencial foram identificados 12 compostos, sendo timol, α -
45 terpineno e 4-terpineol os compostos majoritários. A CIM e a CFM dos 42 isolados de
46 *M. pachydermatis* variaram de $\leq 0,87$ a 7mg/mL, com valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ de 1,18
47 e 3,28mg/mL, respectivamente. Com este estudo foi possível concluir que *M.*
48 *pachydermatis* é sensível ao óleo essencial de orégano mesmo em concentrações baixas.
49 Desta maneira, o óleo essencial de orégano apresenta-se como promissor de novos
50 fármacos para o tratamento das otites e dermatites fúngicas na clínica de pequenos
51 animais.

52 **Palavras-chave:** Cães, extratos vegetais, leveduras, orégano, suscetibilidade

53

54 ABSTRACT

55 The aim of this study was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of essential oil of
56 *Origanum vulgare* against clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. The dried
57 leaves of *O. vulgare* were purchased from a commercial distributor with quality and
58 origin certified and referred for essential oil extraction and chromatography. For *in vitro*
59 testing the technique was microdilution (CLSI M27A3) with modifications to
60 phytochemicals and *M. pachydermatis*. The essential oil of *O. vulgare* was tested at
61 concentrations from 28 to 0.87mg/mL in Sabouraud broth diluted with 1% of tween 80.
62 All isolates were tested in duplicate. In chromatographic analysis of the essential oil
63 were identified 12 compounds, and thymol, α -terpinene, 4-terpineol were the major
64 compounds. The MIC and the MFC of the 42 isolates of *M. pachydermatis* ranged from
65 ≤ 0.87 to 7mg/mL with MIC₅₀ and MIC₉₀ values of 1.18 and 3.28 mg/mL, respectively.
66 With this study it was concluded that *M. pachydermatis* is sensible to *O. vulgare*
67 essential oil even at low concentrations. Thus, the essential oil of *O. vulgare* is

68 presented as bioprospecting in the promising new drugs for the treatment of fungal otitis
69 and dermatitis in the small animal clinic.

70 **Keywords:** Dogs, plant extracts, yeasts, oregano, susceptibility

71

72 INTRODUÇÃO

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

79 Atualmente, políticas federais de incentivo às pesquisas, visando o uso seguro e
80 eficaz de fitoterápicos, tem sido implementadas. Neste sentido, a ANVISA (Agência
81 Nacional de Vigilância Sanitária) organizou um manual para divulgação de diversas
82 espécies com potencial terapêutico bem descrito e aceito cientificamente,
83 principalmente para serem utilizadas pelo SUS (Sistema Único de Saúde) (Brasil,
84 2011).

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

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

102 pública, visto que, a mesma já foi isolada e associada à formação de biofilmes, que
103 podem atuar como fonte de infecções hospitalares em pacientes imunocomprometidos,
104 principalmente neonatos (Cannizzo *et al.*, 2007). A resistência de *M. pachydermatis* aos
105 antifúngicos comumente utilizados no tratamento da enfermidade já foi demonstrada
106 por Jesus *et al.* (2011); Fera *et al.* (2009); Nijima *et al.* (2010).

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

112

113 MATERIAL E MÉTODOS

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

120 A análise cromatográfica foi realizada em equipamento CG/FID (Schimadzu,
121 modelo 2010) equipado com uma coluna de sílica DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm)
122 com temperatura inicial de 40°C, ocorrendo um aumento na taxa de 2°C min⁻¹ até atingir
123 145°C, a partir desta temperatura a taxa foi de 10°C min⁻¹ até atingir 280°C,
124 permanecendo nesta temperatura por 10min; Td = 280°C; Tinj = 280°C; Tcol = 40°C;
125 Split = 1:50.

126 Foram preparadas soluções do óleo a 5000 mg L⁻¹ em hexano e dos padrões
127 cromatográficos a 40 mg L⁻¹ (α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -terpineno, p-
128 cimeno, limoneno, 1,8-cineol, terpinoleno, linalol, 4-terpineol, α -terpineol, timol e
129 carvacrol), das quais foram injetadas no cromatógrafo em volume de 1µL. Os
130 constituintes foram identificados por comparação entre o tempo de retenção dos padrões
131 e da amostra.

132 Para realização do teste do óleo essencial de *O. vulgare* foi utilizada a técnica de
133 microdiluição em caldo de acordo com o documento M27A3 do CLSI (Clinical and
134 Laboratory Standards Institute) com modificações para fitofármacos e *M. pachydermatis*
135 (Nascente *et al.*, 2003; Cleff *et al.*, 2010a).

136 Foram estudados 42 isolados de *M. pachydermatis* provenientes de casos
137 clínicos de otites (n=35) e de dermatites (n=7) em cães que encontravam-se estocados
138 na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da UFPel.
139 Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens (48h) em ágar Sabouraud
140 dextrose acrescido de cloranfenicol. As colônias foram suspensas em solução salina
141 estéril, homogeneizadas e ajustadas em espectrofotômetro com comprimento de onda
142 530nm e transmitância entre 60-65%. A partir desta solução foi realizada uma diluição
143 de 1:50 em solução salina estéril e, em seguida, uma diluição de 1:20 em meio
144 Sabouraud líquido, a qual foi dispensada em alíquotas de 100µL nos poços das
145 microplacas. O óleo essencial de orégano foi testado nas concentrações de 28 a
146 0,87mg/mL diluído em caldo Sabouraud com 1% de Tween 80. Todos os isolados
147 foram testados em duplicata.

148 Depois de preenchidas, as microplacas foram incubadas a 35°C por 72h para
149 realização da leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Posteriormente, foi
150 realizada a transferência de 10µL de cada poço para placas de Petri contendo ágar
151 Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, as quais foram e incubadas a 35°C por
152 72h para leitura da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

153 Os dados da CIM e CFM relacionados como valores em que 50% (CIM₅₀) e
154 90% (CIM₉₀) dos isolados foram inibidos. *M. pachydermatis* foi classificada como
155 sensível (S) quando CIM da amostra < CIM₅₀, sensibilidade intermediária (I) quando
156 CIM₅₀ < CIM da amostra ≤ CIM₉₀ e resistente (R) quando MIC da amostra > CIM₉₀,
157 conforme descrito por Nascente *et al.* (2006) que utilizou antifúngicos convencionais.

158

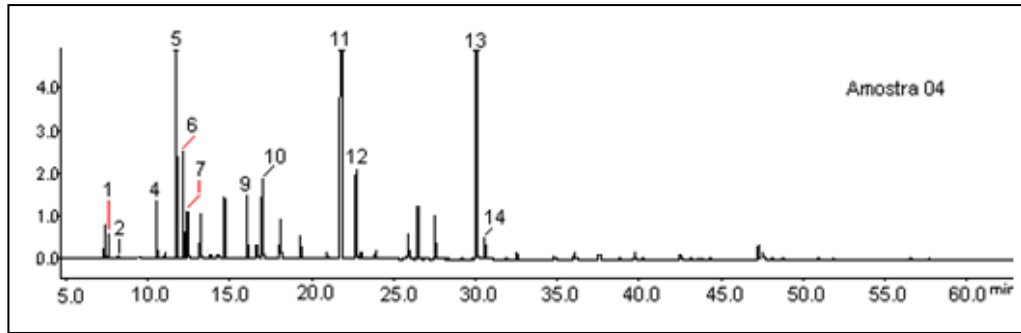
159 RESULTADOS

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

165

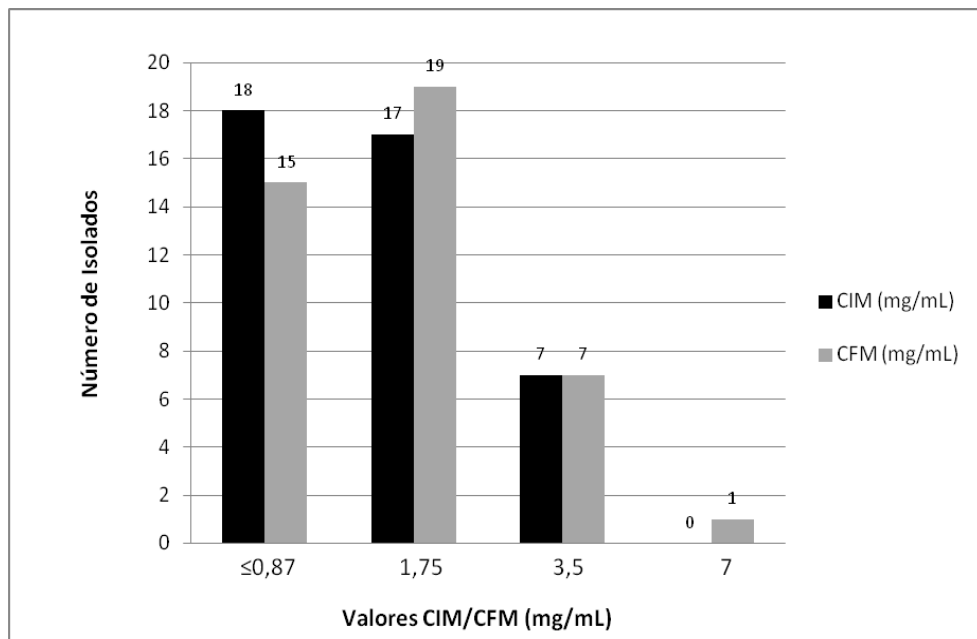
166

167



168 Figura 1 – Padrões utilizados e os picos dos constituintes encontrados na cromatografia gasosa
 169 da amostra de *Origanum vulgare*, sendo: 1- α -pineno; 2- canfeno; 3- β -pineno; 4- mircenol; 5-
 170 α -terpineno; 6- p-cimeno, 7- Limoneno, 8- 1,8-cineol, 9- terpinoleno, 10- linalol, 11- 4-
 171 terpineol, 12- α -terpineol, 13- timol e 14- carvacrol.
 172

173 A CIM e a CFM dos 42 isolados de *M. pachydermatis* variaram de $\leq 0,87$ a
 174 7mg/mL, com valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ de 1,18 e 3,28mg/mL, respectivamente. A CIM
 175 e CFM do óleo de orégano para os isolados de dermatite foi de 1,75mg/mL para três
 176 isolados, $\leq 0,87$ mg/mL para dois isolados, 3,5mg/mL para um isolado e apenas um
 177 isolado com diferença de CIM e CFM, respectivamente $\leq 0,87$ e 1,75mg/mL. Os
 178 resultados com os valores de CIM e CFM estão distribuídos na Fig. 2.
 179



180
 181 Figura 2 – Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida
 182 Mínima (CFM) do óleo essencial de orégano frente a diferentes isolados clínicos de *M.*
 183 *pachydermatis* provenientes de otite e dermatite em cães.
 184

185 Quanto à sensibilidade, os isolados foram classificados em sensíveis,
 186 intermediários e resistentes de acordo com a CIM₅₀ e CIM₉₀ (Tab.1).

187

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

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

190 S: sensível; I: Intermediária; R: Resistente

191

192 DISCUSSÃO

193 A busca por alternativas para a terapêutica da malasseziose justifica-se, uma vez
 194 que tem sido descrita a ocorrência de resistência antifúngica por parte desta levedura,
 195 além do aumento de casos crônicos e recidivantes (Machado *et al.*, 2003; Santos *et al.*,
 196 2008; Fera *et al.*, 2009), sendo reconhecida a importância clínica de *M. pachydermatis*,
 197 principalmente nos casos de otite externa em pequenos animais (Nobre *et al.*, 1998;
 198 Nascente *et al.*, 2004). Além disso, *M. pachydermatis* tem se mostrado sensível a
 199 diferentes extratos vegetais e óleos essenciais de diversos produtos naturais, inclusive
 200 em concentrações baixas (Cardoso *et al.*, 2010; Lee e Lee, 2010), demonstrando a
 201 atividade promissora dos produtos naturais frente ao agente.

202 Os dados obtidos na análise cromatográfica do óleo estão de acordo com a
 203 literatura, sendo que os fenóis como carvacrol, timol, γ -terpeno e *p*-cimeno podem
 204 alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo de *O. vulgare* (Simões *et al.*,
 205 2003; Cleff, 2008). O timol foi um dos principais componentes isolados do óleo
 206 essencial estudado, concordando com os achados de Pistelli *et al.* (2012), cujo principal
 207 constituinte de *O. vulgare* foi o timol e com menores quantidades de *p*-cimeno. O timol
 208 e o carvacrol têm sido considerados como marcadores, pois são os componentes que
 209 identificam o *O. vulgare*, conforme foi encontrado por Cleff (2008) que avaliou a
 210 composição química de oito amostras do óleo essencial de orégano e, identificou os
 211 compostos como timol, carvacrol, α -pineno e 4-terpineol, que variaram em suas
 212 concentrações.

213 Os constituintes 4-terpineol e α -terpineno têm sido descritos como responsáveis
 214 pela ação antimicrobiana do orégano (Lambert *et al.*, 2001; Ultee *et al.*, 2002; Chami *et*
 215 *al.*, 2004). Desta forma, provavelmente estas altas concentrações contribuíram para os
 216 resultados de CIM e CFM para *M. pachydermatis*. Além disso, é possível que núcleos
 217 aromáticos, contendo um grupo polar, possam fazer ligações de hidrogênio com os

218 sítios ativos de enzimas microbianas, favorecendo esta atividade (Lambert *et al.*, 2001;
219 Ultee *et al.*, 2002).

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

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

232 A atividade antifúngica de *O. vulgare* tem sido descrita frente a diversos fungos,
233 especialmente leveduras do gênero *Candida* (Cleff *et al.*, 2010a; Cleff *et al.*, 2010b;
234 Manohar *et al.*, 2001; Chami *et al.*, 2004). Estes estudos divergem em aspectos como,
235 origem do óleo essencial e composição química, origem dos isolados e metodologia do
236 teste de sensibilidade utilizado. Alguns autores vêm utilizando extratos vegetais em
237 isolados de *M. pachydermatis*, incluindo extratos de *O. vulgare* (Cleff *et al.*, 2010a;
238 Prestes *et al.*, 2008; Lee e Lee, 2010; Galuppi *et al.*, 2010; Pistelli *et al.*, 2012). Porém,
239 estudos com espécies de *Malassezia* ainda são insipientes, principalmente utilizando
240 isolados provenientes de animais.

241 O óleo essencial de orégano utilizado no presente estudo apresentou CIM e CFM
242 $\leq 0,87$ a 7mg/mL, valores considerados baixos para os isolados de *M. pachydermatis*,
243 corroborando com outros autores (Rusenova e Parvanov, 2009; Prestes *et al.*, 2008;
244 Galuppi *et al.*, 2010) em relação a sensibilidade da levedura ao óleo essencial. E ainda,
245 Cleff *et al.* (2010a) obteve valores entre 0,015 a 0,001% menores que os encontrados
246 neste estudo. Já valores muito semelhantes foram observados por Prestes *et al.*, 2008;
247 Rusenova e Parvanov (2009), que verificaram atividade antifúngica entre 0,06% e
248 0,25% do óleo essencial de orégano. Segundo Galuppi *et al.* (2010), o óleo essencial de
249 orégano está entre os mais eficientes quando comparados aos 23 óleos testados em seu
250 estudo frente a diferentes espécies de *Malassezia*. Para Pistelli *et al.* (2012), o óleo

251 essencial de orégano apresentou CIM de 0,8%, valores estes superiores aos encontrados
252 em nosso estudo.

253

254 **CONCLUSÃO**

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

259

260 **AGRADECIMENTOS**

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

264

265 **REFERÊNCIAS**

266 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da
267 Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa,
268 2011, 126p.

269 CABAÑES, F. J.; VEJA, S.; CASTELL, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast
270 species isolated from rabbit skin. *Med. Mycol.*, n.49, p.40–48, 2011.

271 CAMPBELL, J. J.; COYNER, K. S.; RANKIN, S. C. et al. Evaluation of fungal flora in
272 normal and diseased canine ears. *Vet. Dermatol.*, v.21, p.619-25, 2010.

273 CANNIZZO, F. T.; ERASO, E.; EZKURRA, P. A. et al. Biofilm development by
274 clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. *Med. Mycol.*, v.45, p.357-361.

275 CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G. et al. Antimicrobial activity of
276 propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia*
277 *pachydermatis* of canine otitis. *Vet. Microbiol.*, v.142, p.432–434, 2010.

278 CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S. et al. Antifungal Treatment With Carvacrol and
279 Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *Braz. J. Infect. Dis.*, v.8,
280 p.217-226, 2004.

281 CLEFF, M. B.; MEINERZ, A.R.M; FARIA, R.O. et al. Atividade inibitória do óleo
282 essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq. Bras. Med.*
283 *Vet. e Zootec.*, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010a.

- 284 CLEFF, M.B.; MEINERZ, A. R. M.; XAVIER, M. et al. *In vitro* susceptibility of
285 *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Braz. J. Microbiol. (Impresso)*,
286 v.41, p. 116-123, 2010b.
- 287 CLEFF, M.B. *Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de Origanum*
288 *vulgare L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em Candida spp.*
289 2008. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária,
290 Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.
- 291 CLSI M27A3. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of*
292 *Yeasts*. Approved Standard-Third Edition, 2008.
- 293 FERA, M.T., CAMERA, E.L.C., DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins:
294 mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. *Expert. Rev. Anti. Infect.*
295 *Ther.* v.7, p.981–998, 2009.
- 296 GALUPPI, R.; AURELI, S.; BONOLI, C. et al. Effectiveness of essential oils against
297 *Malassezia* spp.: comparison of two *in vitro* tests. *Mikol. Lek.*, v.17, n.2, p.79-84, 2010.
- 298 JESUS, F.P.K.; LAUTERT, C.; ZANETTE, R.A. et al. *In vitro* susceptibility of
299 fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against
300 azoles. *Vet. Microbiol.*, v.152, p.161–164, 2011.
- 301 LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A Study of the minimum
302 inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and
303 carvacrol. *J. Appl. Microbiol.*, v.91, p.453-462, 2001.
- 304 LEE, J.; LEE, J. Inhibitory effect of Plant Essential Oils on *Malassezia pachydermatis*.
305 *J. Appl. Biol. Chem.*, v.53, n.3, p.184-188, 2010.
- 306 MACHADO. M. L. S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L. et al. Otites e dermatites por
307 *Malassezia* spp. em cães e gatos. *Clin. Vet.*, n.44, p.27-34, 2003.
- 308 MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J. et al. Antifungal activities of origanum oil
309 against *Candida albicans*. *Mol Cel. Biochem.*, v.228, p.111-117, 2001.
- 310 NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M. et al. Ocorrência de *Malassezia*
311 *pachydermatis* em cães e gatos. *Rev. Bras. Med. Vet.*, v.26, n.2, p.79-82, 2004.
- 312 NIJIMA, M., KANO, R., NAGATA, M. et al. An azoleresistant isolate of *Malassezia*
313 *pachydermatis*. *Vet. Microbiol.*, v.149, n.1-2, p.288-290, 2011.
- 314 NOBRE, M. O.; NASCENTE, P. S.; MEIRELES, M. C. et al. Drogas antifúngicas para
315 pequenos e grandes animais. *Ciênc. Rur.*, v.32, n.1, p. 175-184, 2002.

- 316 NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR, L.F. et al. *Malassezia pachydermatis* e
317 outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. *Ciênc. Rur.*, v.28,
318 n.3, p447-452, 1998.
- 319 PISTELLI, L.; MANCIANTI, F.; BERTOLI, A. et al. Antimycotic Activity of Some
320 Aromatic Plants Essential Oils Against Canine Isolates of *Malassezia pachydermatis*:
321 An *in vitro* Assay. *Open Mycol. J.*, n.6, p.17-21, 2012.
- 322 PRESTES, L.S.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. et al. Actividad de extractos
323 de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. *Rev. Cub.*
324 *Plant. Med.*, v.13, p.4-8, 2008.
- 325 RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils
326 against microorganisms of veterinary importance. *Trak. J. Sci.*, v.7, n.1, p.37-43, 2009.
- 327 SANTOS, J. A.; MARTINS, L. A. Atividade *in vitro* de antifúngicos frente a isolados
328 de *Malassezia* spp. de animais atendidos no hospital veterinário da Unipar. *Arq. Ciênc.*
329 *Vet. Zool. Unipar*, Umuarama, v.11, n.2, p.175-178, 2008.
- 330 SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G. et al. *Farmacogn.* Porto
331 Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. 1102p.
- 332 SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O. et al. Orégano (*Origanum vulgare*
333 L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos.
334 *Ver. Hig. Alim.*, v.19, n.132, p.40-45, 2005.
- 335 ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by
336 *Bacillus cereus*. *J. Food Microbiol.*, v.64, 373-378, 2001.
- 337 VEIGA JR, V. F.; PINTO, A.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura segura?.
338 *Química Nova (Impresso)*, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- 339
- 340
- 341
- 342
- 343
- 344
- 345
- 346
- 347
- 348

4.2 Artigo 2

Sensibilidade de leveduras aos óleos essenciais de *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*

Rosema Santin, Mariane Dias de Araújo Silva, Eduardo Negri Mueller, Isabel Martins,
Gabriela Hörnke Alves, Mário Carlos Araújo Meireles,
Marlete Brum Cleff, João Roberto Braga de Mello

Artigo formatado sob normas da Revista Brazilian Journal of Microbiology

26 **Resumo**

27 Objetivou-se avaliar a suscetibilidade *in vitro* das leveduras *Malassezia pachydermatis*,
28 *Candida* spp e *Trichosporon asahii* aos óleos essenciais de *Origanum majorana* e
29 *Rosmarinus officinalis*. Os materiais vegetais foram adquiridos de distribuidor
30 comercial e encaminhados para extração do óleo e cromatografia gasosa. No teste *in*
31 *vitro* foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo (CLSI M27A3) com
32 modificações para fitofármacos e *M. pachydermatis*. Os óleos essenciais foram testados
33 nas concentrações de 60 a 1,87mg/mL e 112,8 a 3,52mg/mL para o óleo de manjerona e
34 alecrim, respectivamente. Todos os isolados foram testados em duplicata. Os compostos
35 majoritários da manjerona foram timol, 4-terpineol e p-cimeno e do óleo essencial de
36 alecrim os compostos α -pineno e 1,8 cineol. Os valores da Concentração Inibitória
37 Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) variaram de $\leq 1,87$ a
38 30mg/mL para o óleo essencial de manjerona e de $\leq 3,52$ a 112,8mg/mL para o óleo
39 essencial de alecrim para as leveduras *M. pachydermatis*, *Candida* spp e *T. asahii*.
40 Tanto o óleo essencial de manjerona, como o óleo essencial de alecrim apresentaram
41 valores de CIM e CFM mais baixos para os isolados de *M. pachydermatis*. Conclui-se
42 que os óleos essenciais de *O. majorana* e *R. officinalis* possuem atividade antifúngica *in*
43 *vitro* frente a leveduras isoladas de animais.

44 **Palavras-chave:** Alecrim, manjerona, *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp,
45 *Trichosporon*

46

47 **Introdução**

48 A resistência de alguns microrganismos aos fármacos convencionais, aliado a
49 busca por terapias menos tóxicas e por medicamentos com menores efeitos adversos e o
50 menor custo tornam a fitoterapia cada vez mais popular em veterinária, estimulando

51 assim, a avaliação de diferentes extratos de plantas (4, 10, 13). Nesta linha de pesquisa,
52 destacam-se as plantas da família Lamiaceae, que por serem ricas em óleos essenciais,
53 caracterizam-se pela alta quantidade de compostos fenólicos, os quais acredita-se serem
54 responsáveis por propriedades antimicrobianas (14).

55 A manjerona (*Origanum majorana*) e o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) são
56 condimentos amplamente utilizados na culinária mundial. Contudo, estes também
57 possuem valor medicinal, apresentando atividade antibacteriana, antifúngica e
58 antioxidante (1, 3, 7, 9, 13, 16, 19, 29, 30, 32).

59 As enfermidades fúngicas estão entre aquelas que apresentam problemática em
60 relação à terapêutica, e são cada vez mais frequentes na clínica veterinária. *Malassezia*
61 *pachydermatis* é uma levedura comensal da pele, meato acústico externo e mucosas de
62 diferentes espécies animais. Quaisquer alterações, como aumento da temperatura,
63 umidade e substrato, bem como desequilíbrio na imunidade do hospedeiro podem
64 desencadear o aparecimento da malasseziose, que ocorre devido à multiplicação
65 excessiva desta levedura (25, 27). O mesmo ocorre com as leveduras do gênero
66 *Candida* que também fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal, respiratório e
67 membranas mucosas de animais domésticos. Diferentes espécies de *Candida* estão
68 comumente envolvidas nas etiologias de infecções micóticas em humanos
69 imunocomprometidos, sendo que a casuística da candidíase em animais de companhia
70 tem aumentado nos últimos anos (11, 24, 28, 37). *Trichosporon asahii* normalmente é
71 isolado de mucosas e da pele de animais hígidos (23, 31), porém esta levedura também
72 pode estar relacionada a casos clínicos (33).

73 É relevante destacar ainda, a importância que estas leveduras possuem na
74 medicina humana atuando como oportunistas e como fontes de contaminação através da
75 formação de biofilme (6, 17).

76 Tendo em vista o uso das plantas com potencial medicinal e a importância das
77 leveduras na medicina veterinária, objetivou-se avaliar a suscetibilidade *in vitro* das
78 leveduras *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp e *Trichosporon asahii* aos óleos
79 essenciais de *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*.

80

81 **Material e Métodos**

82 *Material vegetal, óleo essencial e análise cromatográfica*

83 *O. majorana* (manjerona) e *R. officinalis* (alecrim) foram adquiridos de
84 distribuidor comercial (Luar Sul[®], Santa Cruz do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil) com
85 certificado de qualidade e origem. Para obtenção dos óleos essenciais, as folhas secas
86 foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger, segundo a
87 Farmacopéia Brasileira IV, durante 4h. Após, no óleo obtido foi adicionado sulfato de
88 sódio anidro p.a para secagem, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração
89 até a utilização.

90 As análises cromatográficas foram realizadas em equipamento CG/FID
91 (Schimadzu, modelo 2010) equipado com uma coluna de sílica DB-5 (30m x 0,25mm x
92 0,25µm) com temperatura inicial de 40°C, ocorrendo um aumento na taxa de 2°C min⁻¹
93 até atingir 145°C, a partir desta temperatura a taxa foi de 10°C min⁻¹ até atingir 280°C,
94 permanecendo nesta temperatura por 10min; Td = 280°C; Tinj = 280°C; Tcol = 40°C;
95 Split = 1:50.

96 Foram preparadas soluções do óleo a 5000 mg L⁻¹ em hexano e dos padrões
97 cromatográficos a 40 mg L⁻¹ (α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-terpineno, p-
98 cimeno, limoneno, 1,8-cineol, terpinoleno, linalol, 4-terpineol, α-terpineol, timol e
99 carvacrol), das quais foram injetadas na coluna do cromatógrafo em volume de 1µL. Os

100 constituintes foram identificados por comparação entre o tempo de retenção dos padrões
101 e das amostras.

102

103 *Isolados fúngicos*

104 Foram estudados onze isolados de *Malassezia pachydermatis* provenientes de
105 casos clínicos de otites em cães, quatro isolados de *Candida* spp, sendo dois isolados de
106 *C. albicans*, um de *C. famata* e um de *C. parapsilosis* e, *Trichospon asahii* (n=7)
107 provenientes da cavidade oral de cães hípidos.

108 Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens em ágar Sabouraud
109 dextrose acrescido de cloranfenicol. Uma alçada de cada colônia foi suspensa em
110 solução salina estéril, homogeneizada e ajustada em espectrofotômetro com
111 comprimento de onda 530nm e transmitância de 60-65% para *M. pachydermatis* e 70-
112 76% para *Candida* spp e *T. asahii*. A partir desta solução foi realizada uma diluição de
113 1:100 em solução salina estéril e, em seguida, outra diluição de 1:20 em meio
114 Sabouraud líquido para *M. pachydermatis* e RPMI para *Candida* e *T. asahii*. Esta última
115 diluição foi adicionada às microplacas para o teste. Todos os isolados foram testados em
116 duplicata.

117

118 *Teste de microdiluição em caldo*

119 Para realização do teste de suscetibilidade *in vitro* foi utilizada a técnica de
120 Microdiluição em Caldo de acordo com o documento M27A3 do CLSI (Clinical and
121 Laboratory Standars Institute) (12) com modificações para óleos essenciais e *M.*
122 *pachydermatis* (8). O óleo essencial de manjerona foi testado nas concentrações de 60 a
123 1,87mg/mL e o óleo essencial de alecrim de 112,8 a 3,52mg/mL, em ambos adicionou-
124 se tween 80 a 1% ao meio de cultura para facilitar a homogeneização.

125 Depois de preenchidas, as microplacas foram incubadas a 35°C por 72h para
126 realização da leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Posteriormente, foi
127 realizada a transferência de 10µL de cada pocinho para placas de Petri contendo ágar
128 Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, as quais foram e incubadas a 35°C por
129 72h para leitura da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

130 Os dados da CIM e CFM foram relacionados como valores em que 50% (CIM₅₀
131 e CFM₅₀) e 90% (CIM₉₀ e CFM₉₀) dos isolados foram inibidos.

132

133 *Análise estatística*

134 Os dados foram analisados pelo Programa Statistix 9.0 através da análise de
135 variância (ANOVA) e teste de Tukey na comparação entre médias. Valores de p<0,05
136 foram considerados estatisticamente significativos.

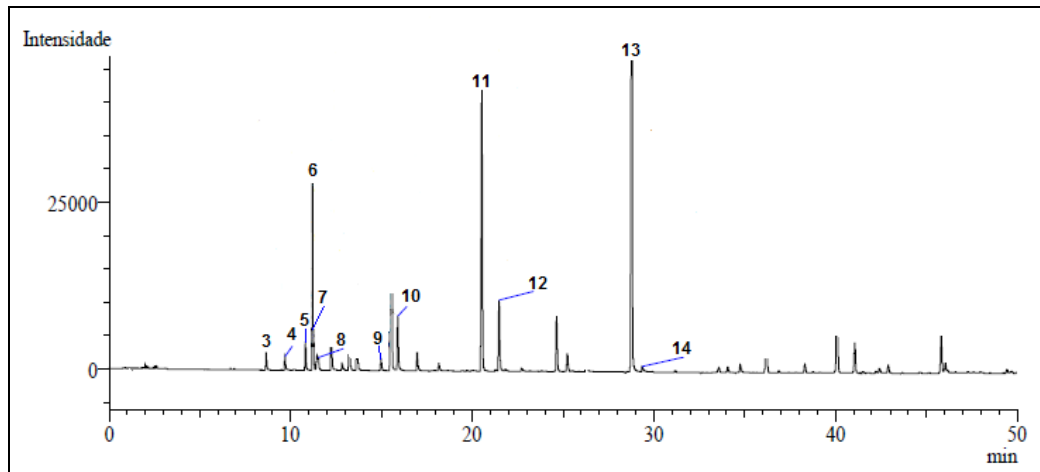
137

138 **Resultados e discussão**

139 Os resultados obtidos através do teste de suscetibilidade *in vitro* demonstraram a
140 atividade antifúngica do óleo essencial de manjerona e alecrim. Na análise
141 cromatográfica do óleo essencial de manjerona foram identificados 12 constituintes,
142 sendo timol (pico 13), 4-terpineol (pico 11) e p-cimeno (pico 6) os compostos
143 majoritários (Figura 1). Timol, carvacrol, 4-terpineol e p-cimeno são descritos como
144 constituintes deste óleo, sendo o timol e carvacrol considerados majoritários (21, 22), o
145 que foi observado parcialmente no presente estudo já que o maior concentração foi de
146 timol. Entretanto, outros autores ao avaliar a composição do óleo essencial de
147 manjerona também encontraram valores abaixo de carvacrol (5). Sabe-se que os
148 compostos presentes nos extratos, são influenciados por fatores diversos, destacando-se
149 clima, sazonalidade, áreas geográficas, assim como pelas condições de cultivo, estágio

150 de desenvolvimento, período de colheita do vegetal e técnica de obtenção do produto
 151 derivado (34).

152



153

154 Figura 1 – Padrões utilizados e os picos dos constituintes encontrados na
 155 cromatografia gasosa da amostra de *Origanum majorana*, sendo: 1- α -pineno;
 156 2- canfeno; 3- β -pineno; 4- mirceno; 5- α -terpineno; 6- p-cimeno, 7-
 157 Limoneno, 8- 1,8-cineol, 9- terpinoleno, 10- linalol, 11- 4-terpineol, 12- α -
 158 terpineol, 13- timol e 14- carvacrol.

159

160 No óleo essencial de alecrim também foram identificados 12 contituintes, tendo
 161 como compostos majoritários α -pineno (pico 1) e 1,8 cineol (pico 8) (Figura 2).

162 Segundo Angioni et al. (1), Cleff et al. (9) α -pineno e 1,8 cineol estão entre os
 163 contituintes majoritários na análise cromatográfica do óleo, confirmando os achados no
 164 presente estudo.

165

166

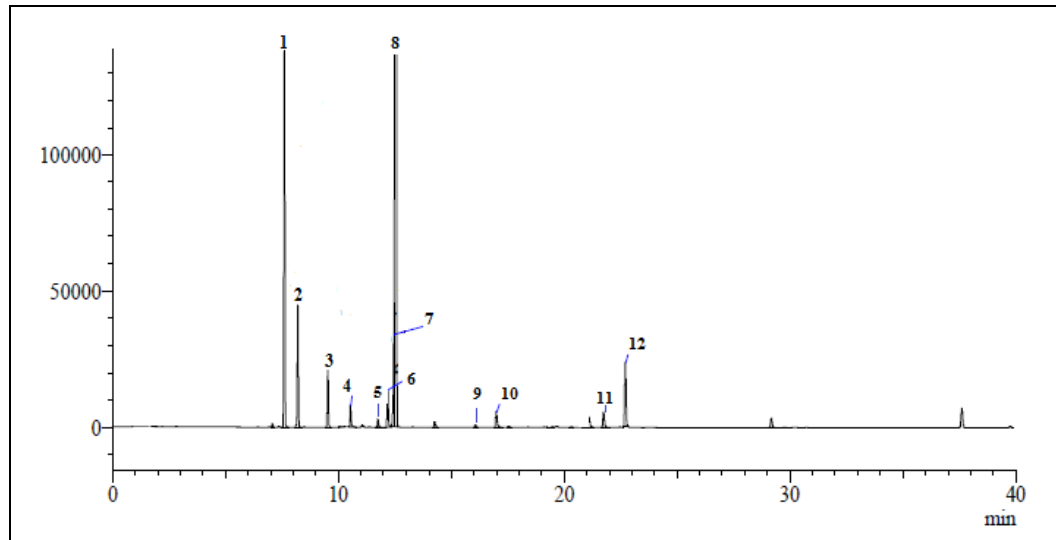
167

168

169

170

171



172
173
174
175
176
177
178

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

179 De acordo com Wang et al. (36) α -pineno e 1,8 cineol, compostos majoritário do
180 óleo essencial de alecrim, já foram estudados separadamente, apresentando atividade
181 antibacteriana e anticancerígena *in vitro* muito semelhante ao óleo essencial na sua
182 forma pura. Demonstrando que estes podem ser considerados como compostos ativos e,
183 responsáveis pela atividade antimicrobiana observada no presente estudo, porém quando
184 associados a outros constituintes, no caso o óleo essencial, apresentam atividade mais
185 elevada.

186 Os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida
187 Mínima (CFM) variaram de $\leq 1,87$ a 30mg/mL para o óleo essencial de manjerona e de
188 $\leq 3,52$ a 112,8mg/mL para o óleo essencial de alecrim frente as leveduras *M.*
189 *pachydermatis*, *Candida* spp e *T. asahii* (Tabela 1).

190
191

192 Tabela 1 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida
 193 Mínima (CFM) do óleo essencial de manjerona e alecrim sobre isolados de
 194 *M.pachydermatis*, *Candida spp* e *T. asahii*

Isolados	Óleo essencial de manjerona		Óleo essencial de alecrim	
	CIM	CFM	CIM	CFM
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
1M	3,75	3,75	14,1	14,1
2M	3,75	3,75	3,52	7,05
3M	≤1,87	≤1,87	7,05	14,1
4M	≤1,87	≤1,87	7,05	7,05
5M	≤1,87	≤1,87	14,1	14,1
6M	≤1,87	≤1,87	≤3,5	≤3,52
7M	≤1,87	≤1,87	7,05	14,1
8M	≤1,87	≤1,87	≤3,52	≤3,52
9M	≤1,87	≤1,87	≤3,52	7,05
10M	≤1,87	≤1,87	≤3,52	7,05
11M	≤1,87	≤1,87	≤3,52	≤3,52
1C	3,75	7,5	28,2	28,2
2C	7,5	7,5	7,05	7,05
3C	15	15	28,2	28,2
4C	7,5	7,5	14,1	14,1
1T	30	30	112,8	112,8
2T	3,75	3,75	14,1	14,1
3T	7,5	7,5	28,2	28,2
4T	7,5	7,5	28,2	28,2
5T	7,5	15	56,4	56,4
6T	7,5	15	28,2	28,2
7T	30	30	112,8	112,8

195 *M – *Malassezia pachydermatis*; T – *Trichosporon asahii*; 1C – *Candida albicans*; 2C – *Candida*
 196 *famata*; 3C – *Candida parapsilosis*; 4C – *Candida albicans*
 197

198 Através dos resultados pode-se perceber que os isolados de *M. pachydermatis*,
 199 *Candida spp* e *T. asahii* foram mais sensíveis ao óleo essencial de manjerona, cuja CIM

200 e CFM foram sempre inferiores. Para os isolados de *M. pachydermatis* não houve
201 diferença estatística entre os dois óleos, para CIM ($p=0,44$) e CFM ($p=0,54$). Contudo,
202 para os isolados de *Candida* spp e *T. assahii* esta diferença entre os óleos foi
203 estatisticamente significativa tanto para CIM quanto para CFM ($p=0,002$ e $p=0,003$,
204 respectivamente).

205 A baixa atividade inibitória do óleo essencial de alecrim contra *Candida*
206 *albicans* também já foi demonstrada por Angioni et al. (1). Em contrapartida, Cleff et
207 al. (9) encontraram resultados de CIM e CFM menores, e ainda, Freire et al. (15)
208 demonstram atividade antifúngica do óleo essencial em concentrações mais baixas 1% e
209 2%, porém a técnica utilizada foi diferente deste estudo. Essa problemática na
210 comparação entre dados sobre a suscetibilidade *in vitro* devido a diferença entre
211 técnicas já foi relatada por Nascimento et al. (26).

212 A atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjerona também tem sido
213 comprovada com valores de CIM de 1,1 e 1,6mg/mL frente a bactérias Gram positivas e
214 negativas, respectivamente. Estes valores são semelhantes aos encontrados para *M.*
215 *pachydermatis*, porém para os isolados de *Candida* spp e *T. asahii* estes valores ficaram
216 abaixo de nosso estudo (5). Souza et al. (35) verificaram a atividade antifúngica do óleo
217 essencial de *Origanum majorana* apresentando resultados de CIM de 160 μ L/mL para
218 isolados de *Candida* spp, valores estes superiores aos encontrados nesta pesquisa.

219 A CIM₅₀ e a CFM₅₀ do óleo essencial de manjerona para os isolados de *M.*
220 *pachydermatis* não foi possível calcular, pois seria necessária a utilização de
221 concentrações mais baixas para afirmar a concentração ideal a ser utilizada. Analisando
222 os dados pode-se perceber que a CIM₅₀ e CFM₅₀, bem como a CIM₉₀ e CFM₉₀ do óleo
223 essencial de alecrim foi sempre maior, tanto para os isolados de *M. pachydermatis* como

224 também para os isolados de *Candida* spp e *Trichosporon asahii* que foram analisados
225 em conjunto (Tabela 2).

226

227 Tabela 2 – Valores de CIM₅₀ e CFM₅₀ e CIM₉₀ e CFM₉₀ dos óleos essenciais de
228 manjerona e alecrim frente a isolados de *M. pachydermatis*, *Candida* spp e *T. asahii*

Isolados		CIM ₅₀ (mg/mL)	CIM ₉₀ (mg/mL)	CFM ₅₀ (mg/mL)	CFM ₉₀ (mg/mL)
<i>M.pachydermatis</i>		3,75	7,82	5,26	11,06
Óleo essencial de Alecrim	<i>Candida</i> spp +	20,78	36,94	20,78	36,94
	<i>T. asahii</i>				
	Geral	8,98	27,61	10,46	28,58
<i>M.pachydermatis</i>		-	2,56	-	2,56
Óleo essencial de Manjerona	<i>Candida</i> spp +	6,05	14,8	10,83	16,07
	<i>T. asahii</i>				
	Geral	3,02	8,09	3,35	10,24

229

230 Tanto o óleo essencial de manjerona, como o óleo essencial de alecrim
231 apresentaram valores de CIM e CFM mais baixos para os isolados de *M. pachydermatis*.
232 Estes achados, possivelmente retratam a maior facilidade de rompimento da parede
233 deste fungo, já que as leveduras do gênero *Malassezia* possuem uma parede celular
234 muito fina, envolta por uma camada lamelar ou capsular que contém lipídeos, podendo
235 ser facilmente removida com solventes (2), diferente dos gêneros *Candida* e
236 *Trichosporon* que apresentam uma parede celular dupla (18, 20).

237

238 Conclusão

239 Com os resultados encontrados, é possível concluir que os óleos essenciais de *O.*
240 *majorana* e *R. officinalis* possuem atividade antifúngica *in vitro* frente a leveduras
241 isoladas de animais.

242

243 **Agradecimentos**

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

247

248 **Conflitos de Interesse**

249 Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

250

251 **Referências**

- 252 1. Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coisson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V,
253 Cabras P (2004) Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and
254 antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. J Agric
255 Food Chem 52(11):3530-3535.
- 256 2. Ashbee HR (2007) Update on the genus *Malassezia* Med Mycol 45:287-303.
- 257 3. Bizzo HR, Hvell AMC, REZENDE CM (2009) Óleos essenciais no Brasil: aspectos
258 gerais, desenvolvimento e perspectivas Química Nova 32(3):588-594.
- 259 4. Buffon MCM, Lima MLC, Galarda I, Cogo L (2001) Avaliação da eficácia dos
260 extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma*
261 *zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “in vitro”
262 Rev Visao Adem 2(1):31-8.
- 263 5. Busatta C, Vidal RS, Popiolski, AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MRA, Corazza
264 FC, Corazza, ML, Oliveira, VJ, Cansian RL (2008) Application of *Origanum majorana*
265 L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage Food Microbiol 25:207–211.

- 266 6. Cannizzo FT, Eraso E, Ezkurra PA, Villar-Vidal M, Bollo E, Castellá G, Cabañes FJ,
267 Vidotto V, Quindós G (2007) Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia*
268 *pachydermatis* Med Mycol 45:357-361.
- 269 7. Celiktas OY, Kocabas EEH, Bedir E, Sukan FV, Ozek T, Baser KHC (2007)
270 Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus*
271 *officinalis*, depending on location and seasonal variations. Food Chem 1(100):553-559.
- 272 8. Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, Rodrigues
273 MR, Meireles MCA (2010) Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos
274 de importância médica e veterinária Arq Bras Med Vet Zootec 62(5):1291-1294.
- 275 9. Cleff MB, Meinerz ARM, Madrid I, Fonseca AO, Alves GH, Meireles MCA,
276 Rodrigues MRA (2012) Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero
277 *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. Rev Bras
278 Plantas Med 14(1):43-49.
- 279 10. Cleff MB, Santin R (2009) Homeopatia e fitoterapia. In: Nobre, M.O., Mueller,
280 E.N., Campello-Félix, A.O., Tillmann, M.T. (orgs). Tópicos em criação e clínica de
281 cães. Editora e Gráfica Universitária da UFPel, Pelotas, Brasil, 121-128.
- 282 11. Cleff MB, Silva GM, Meinerz ARM, Madrid IM, Martins AA, Fonseca AO,
283 Nascente PS, Meireles, MCA, Mello JRB (2007) Infecção cutânea em cão por *Candida*
284 *albicans* Rev Vet Zootec 14(2):164-8.
- 285 12. CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth
286 Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - M27-A3 (2008) Approved
287 Standard-Third Edition.
- 288
- 289

- 290 13. Costa ACBP, Pereira CA, Freire F, Junqueira JC, Jorge AOC (2009) Atividade
291 antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini*
292 Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*.
293 Rev Odontol UNESP 38(2):111-116.
- 294 14. Ferrara LK, Montesanto D, Chiantese C (2003) *Origanum marjoran* L. in medicine
295 and foods. Ingredientia Alimentaria 2:23-25.
- 296 15. Freire ICM, Gouveia CL, Figueiredo RDA, Leite MLAS, CAVALCANTI YW,
297 Almeida LFD, Padilha WWN (2012) Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de
298 *Rosmarinus officinalis* Sobre a Cinética do Crescimento de *Candida albicans* e *Candida*
299 *tropicalis* Revista Brasileira de Ciências da Saúde 16(3):343-346.
- 300 16. Gachkar L, Yadegari D, Rezaei MB, Taghizadeh M, Astaneh SA, Rasooli I (2007)
301 Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus*
302 *officinalis* essential oils Food Chem 102(3):898-904.
- 303 17. Gasparetto A, Negri MFN, Paula CR, Svidzinski TIE (2005) Produção de biofilme
304 por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária Acta
305 Scientiarum Health Sciences 27(1):37-40.
- 306 18. Gow NAR, Veerdonk FAJP, Netea MG (2012) *Candida albicans* morphogenesis
307 and host defence: discriminating invasion from colonization Nat Rev Microbiol 10:112-
308 122.
- 309 19. Kabouche Z, Boutaghane N, Laggoune S, Kabouche A, Ait-Kaki Z, Bemblabed K
310 (2005) Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria.
311 International Journal Aromatherapy 15(3):129-33.
- 312 20. Lacaz CS, Porto E, Martins JEC, Heins-Vaccari EM, Melo NT (2002) Tratado de
313 Micologia Médica Lacaz. Sarvier, São Paulo, 1104p.

- 314 21. Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ, Nychas GJE (2001) A Study of the
315 minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol
316 and carvacrol. J Appl Microbiol 91:453-462.
- 317 22. Marino M, Bersani C, Comi G (2001) Impedance measurements to study the
318 antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae* Int J Food
319 Microbiol 67:187-195.
- 320 23. Melchert A, Motta YP, Giuffrida R, Laposy CB (2008) Avaliação citológica e
321 microbiológica do lavado broncoalveolar em cães hígidos Semina: Ciências Agrárias
322 29(1):157-164.
- 323 24. Moretti A, Boncio L, Posteraro B, Mechelli L, Balducci M, Fadda G, La Sorda M,
324 Di Chio M, Grelloni V, Agnetti F (2006) Co-cutaneous infection in a dog: pcr-reverse
325 identification of *C. tropicalis* on skin biopsy J Med Mycol 16(1):30-36.
- 326 25. Nascente PS, Nobre MO, Meinerz ARM, Gomes FR, Souza LL, Meireles MCA
327 (2004) Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos Rev Bras Med Vet
328 26(2):79-82.
- 329 26. Nascimento PFC Nascimento AC, Rodrigues CS, Antonioli AR, Santos PO,
330 Barbosa Júnior AM, Trindade RC (2007) Atividade antimicrobiana dos óleos
331 essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev Bras Farmacogn 17(1):108-
332 113.
- 333 27. Nobre MO, Meireles MCA, Gaspar LF, Pereira DIB, Schramm R, Schuch LFD,
334 Souza LL, Souza LS (1998) *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas
335 otites externas e dermatites em cães Cienc Rural 28(3):447-452.
- 336
- 337

- 338 28. Pozzatti P (2007) Suscetibilidade de *Candida* spp sensíveis e resistentes ao
339 fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos. Santa Maria, Brasil,
340 148p. (M.Sc. Dissertation. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa
341 Maria).
- 342 29. Prins CL, Lemos CLS, Freitas SP (2006) Efeito do tempo de extração sobre a
343 composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) Rev
344 Bras Plantas Med 8(4):92-95.
- 345 30. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M, Scaglianti M, Manfredini S, Radice M, Bruni R
346 (2005) Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional
347 antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods Food Chem 91(4):621-32.
- 348 31. Santin R (2009) Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de leveduras
349 isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas. Pelotas, Brasil, 89p. (M.Sc. Dissertation.
350 Faculdade de Veterinária. UFPel).
- 351 32. Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibañez E, Señoráns FJ, Reglero G (2005) Chemical
352 composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil
353 obtained via supercritical fluid extraction J Food Protection 68(4):790-795.
- 354 33. Shareef BT, Harun A, Roziawati Y, Shaiful Bahari I, Deris ZZ, Ravichandran M
355 (2008) Recurrent *Trichosporon asahii* Glossitis: A Case Report J Contemp Dent Pract
356 9(3):114-120.
- 357 34. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR
358 (2003) Farmacognosia da Planta ao Medicamento. Editora da UFRGS/Editora da
359 UFSC, Porto Alegre, 1102p.
- 360 35. Souza NAB, Lima EO, Guedes DN, Pereira FO, Souza EL, Sousa FB (2010)
361 Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi Braz J
362 Pharm Sci 46(3):499-508.

- 363 36. Wang W, Li N, Luo M, Zu Y, Efferth T (2012) Antibacterial Activity and
364 Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its
365 Main Components *Molecules* 17:2704-2713.
- 366 37. Yurayart C, Chindamporn A, Suradhat S, Tummaruk P, Kajiwarara S, Prapasarakul N
367 (2011) Comparative analysis of the frequency, distribution and population sizes of
368 yeasts associated with canine seborrheic dermatitis and healthy skin. *Vet Microbiol*
369 148(2-4):356-362.

4.3 Artigo 3

**Avaliação da irritação cutânea e ocular aguda e sensibilização cutânea do óleo
essencial de *Origanum vulgare***

Rosema Santin, Isabel Martins Madrid, Claudia Giordani, Fernanda Bastos de Mello,
Mário Carlos Araújo Meireles, Marlete Brum Cleff;
João Roberto Braga de Mello

**Artigo formatado sob normas da Revista *Regulatory Toxicology and
Pharmacology***

1 **Avaliação da irritação cutânea e ocular aguda e sensibilização cutânea do óleo**
2 **essencial de *Origanum vulgare***

3

4 Rosema Santin^{1,*}, Isabel Martins Madrid², Claudia Giordani³, Fernanda Bastos de
5 Mello⁴, Mário Carlos Araújo Meireles⁵, Marlete Brum Cleff⁶;
6 João Roberto Braga de Mello⁷

7 ¹Msc., Doutoranda - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias - UFRGS
8 seminhavet@yahoo.com.br

9 ²Dsc., Médica Veterinária – Prefeitura Municipal de Pelotas/RS
10 imadrid_rs@yahoo.com.br

11 ³Médica Veterinária, Mestranda – Programa de Pós-Graduação em Veterinária – UFPel
12 claarte@hotmail.com

13 ⁴Profª Adjunto – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
14 (UFCSPA) fernanda.mello@ufrgs.br

15 ⁵Profº Associado – Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária
16 UFPel meireles@ufpel.edu.br

17 ⁶Profª Adjunto – Departamento de Clínicas Veterinária – Faculdade de Veterinária
18 UFPel emebum@bol.com.br

19 ⁷Profº Associado – Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da
20 Saúde - UFRGS jmello@gabinete.ufrgs.br

21

22

23

24

25

26 *Autor para correspondência

27 Endereço: Rua Benjamin Furlan, 120 apto 401 – Bairro São Miguel – Concórdia/SC –

28 CEP 89700-000

29 Email: seminhavet@yahoo.com.br

30 Tel: (49) 88709339

31 **Resumo**

32 Objetivou-se avaliar a irritação/corrosão cutânea e ocular aguda e a sensibilização
33 cutânea do óleo essencial de *Origanum vulgare* (orégano) em modelos experimentais.
34 Os ensaios *in vivo* foram realizados de acordo com a *Organisation for Economic Co-*
35 *operation and Development* (OECD), conforme documentos 404 (2002), 405 (2002) e
36 406 (1992). Nas avaliações de irritação/corrosão cutânea aguda, somente um coelho
37 apresentou eritema pouco perceptível nas 24h, reversível em sete dias. Este mesmo
38 animal também apresentou edema pouco perceptível nas 72h após a retirada do curativo
39 com regressão no sétimo dia. Na irritação/corrosão ocular aguda, apenas um animal
40 apresentou congestão nos vasos episclerais nas avaliações de 24 e 48h com regressão na
41 avaliação das 72h. Na sensibilização cutânea, todos os animais responderam a indução
42 intradérmica e tópica, mas não ao desafio. Conclui-se que o óleo essencial de orégano
43 3% causa irritação cutânea e ocular aguda leve, reversível em sete dias. E, não produz
44 sensibilização cutânea na concentração testada.

45 **Palavras-chave:** cobaios, coelhos, corrosão, formulação, orégano

46

47 **1 Introdução**

48 A busca por novas substâncias com ação antimicrobiana, efeitos indesejáveis
49 mínimos, segurança e eficácia, além de custos reduzidos, é emergente e vem
50 ascendendo dentro da comunidade científica (Cleff et al. 2010; Lorenzi e Matos, 2002;
51 Souza et al. 2005). Isto se reflete principalmente no resgate do uso de plantas
52 medicinais, bem como na busca por metabólitos ativos e princípios isolados (Duarte et
53 al. 2005; Moreira et al. 2010). A grande maioria dos medicamentos, hoje disponíveis no
54 mundo, é ou foi originado de estudos desenvolvidos a partir do conhecimento popular e

55 da prática no uso de plantas medicinais, e que na atualidade faz da rica biodiversidade
56 brasileira, um vasto campo de pesquisa científica (Brasil, 2011).

57 Neste sentido, destaca-se o *Origanum vulgare*, conhecido popularmente como
58 orégano, amplamente utilizado na culinária e na medicina popular e, tem sido avaliado
59 quanto ao efeito terapêutico em enfermidades (Chami et al. 2004; Cleff, 2008, Khan et
60 al. 2011). Seu óleo essencial apresenta alta estabilidade, ausência de contaminação
61 microbiológica e diversidade de componentes químicos que são muito explorados
62 devido ao potencial antimicrobiano (Lambert et al. 2001; Manohar et al. 2001; Souza et
63 al. 2005).

64 O conhecimento da toxicidade é um fator determinante e de relevância no
65 desenvolvimento e consumo dos medicamentos, sendo de fundamental importância na
66 aplicabilidade terapêutica (Melo et al. 2001). As pesquisas realizadas para avaliação do
67 uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes (Veiga
68 Junior et al. 2005). Embora, seja descrito que para garantir o uso seguro e eficaz de
69 produtos naturais, estes devem ser submetidos a testes de eficácia e segurança através de
70 métodos recomendados pela legislação, como estudos pré-clínicos e clínicos (Brasil,
71 2004).

72 Diante do exposto e, considerando a importância dos medicamentos fitoterápicos,
73 das plantas medicinais e dos extratos vegetais, há necessidade de caracterizar os padrões
74 de toxicidade de óleos essenciais. Assim, objetivou-se avaliar a irritação/corrosão
75 cutânea e ocular aguda e a sensibilização cutânea do óleo essencial de *Origanum*
76 *vulgare* em modelos experimentais.

77

78

79

80 **2 Material e Métodos**

81 *2.1 Óleo essencial*

82 O orégano foi adquirido de distribuidor comercial (Luar Sul[®]) com certificação de
83 qualidade e origem. As folhas secas foram encaminhadas ao Centro de
84 Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas
85 (UFPel) para extração do óleo essencial por hidrodestilação em aparelho Clevenger. Os
86 compostos majoritários identificados no óleo através da cromatografia gasosa foram:
87 timol, α -terpineno e 4-terpineol. Após, o óleo essencial foi enviado à farmácia de
88 manipulação veterinária para preparo de formulação a 3% (duas vezes a maior
89 concentração encontrada nos testes de ação antifúngica *in vitro*) utilizando como base
90 loção não iônica e pH final 6,5.

91

92 *2.2 Testes de toxicidade pré-clínica in vivo*

93 Os testes de toxicidade *in vivo* foram realizados de acordo com a *Organisation for*
94 *Economic Co-operation and Development* (OECD). O projeto obteve parecer favorável
95 da Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEAA) da UFPel sob o número 2432.

96 Para os testes de irritação/corrosão cutânea e ocular aguda foram utilizados seis
97 coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), Nova Zelândia, machos, adultos e hígidos. Já
98 para o teste de sensibilização cutânea foram utilizados 33 cobaios (*Cavia porcellus*),
99 n=3 para o ensaio piloto e n=30 para avaliação da sensibilização cutânea do óleo
100 essencial de orégano, todas fêmeas e hígidas. Os coelhos foram mantidos em gaiolas
101 individuais e os cobaios em caixas com cinco animais alojados no Biotério Central da
102 UFPel, recebendo dieta apropriada para cada espécie (suplementação com vitamina C
103 para os cobaios) e água *ad libitum*. O ambiente foi mantido em condições controladas
104 de umidade (30-70%) e temperatura (17-23°C) e com ciclo de claro e escuro de 12

105 horas. Em todos os experimentos, as avaliações foram sempre realizadas por três
106 observadores, simultaneamente. Após o período experimental, os animais foram
107 eutanasiados conforme Resolução nº 1000, de 12 de maio de 2012 do CFMV.

108

109 *2.2.1 Teste de irritação/corrosão cutânea aguda*

110 O teste de irritação/corrosão cutânea aguda foi desenvolvido conforme OECD 404
111 (*Guideline for the testing of chemicals - Acute Dermal Irritation/Corrosion* adaptado
112 em 24 de abril de 2002). Todos os animais foram pesados no início e ao final do
113 experimento e, para cada animal as áreas não tratadas (lado esquerdo) serviram como
114 controle. A formulação contendo óleo essencial de oregano 3% foi testada em dose
115 única em um dos coelhos e, posteriormente nos animais 2 e 3, sendo realizada antes da
116 irritação/corrosão ocular aguda.

117 Vinte e quatro horas antes do início do teste foi realizada tricotomia no flanco
118 direito e esquerdo dos animais. Foi aplicada formulação contendo óleo essencial de
119 orégano 3% em uma área de aproximadamente 6cm² (lado direito) que permaneceu por
120 4h com curativo de gaze e micropore. Após este período, a área na qual foi aplicada a
121 substância foi lavada com solução fisiológica. Todos os animais foram avaliados em
122 escores de 0 a 4, quanto à formação de eritema/escara e edema (Tabela 1), em diferentes
123 tempos de avaliação: imediatamente, 1h, 24h, 48h, 72h e 7 dias após a retirada do
124 curativo.

125

126

127

128

129

130 **Tabela 1-** Escores utilizados na avaliação quanto à formação de eritema/escara e edema
 131 nos diferentes períodos de avaliação, conforme OECD 404 (2002)

Formação de eritema e escaras	Escore
Sem eritema	0
Eritema muito leve (pouco perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema grave severo a formação de escaras	4
Formação de edema	
Sem edema	0
Edema muito leve (pouco perceptível)	1
Edema leve (bordos bem definidos)	2
Edema moderado (aumento de aproximadamente 1mm)	3
Edema severo (aumento superior a 1mm, visível além da área de exposição)	4

132

133 2.2.2 Teste de irritação/corrosão ocular aguda

134 Para realização do teste de irritação/corrosão ocular foi utilizado protocolo OECD
 135 405 (*Guideline for the testing of chemicals - Acute Eye Irritation/Corrosion* adaptado
 136 em 24 de abril de 2002) e desenvolvido após o ensaio de irritação/corrosão cutânea.
 137 Todos os animais foram pesados no início e no final do experimento.

138 Os animais passaram por exame físico e oftálmico 24h antes do início do
 139 experimento. A formulação contendo óleo essencial de oregano 3% foi testada em dose
 140 única em um dos olhos do animal 1 e, posteriormente nos animais 2 e 3. Além disso, 15
 141 minutos antes da administração da substância foi instilado anestésico local nos dois olhos
 142 e administrado 0,1mL da formulação no saco conjuntival de um dos olhos de cada
 143 animal. O outro olho, que permaneceu sem tratamento, serviu como controle. Durante
 144 as avaliações, foi utilizado oftalmoscópio e fluoresceína para visualização do
 145 comprometimento da córnea, com exceção do exame após 1h da aplicação. Após 24h da
 146 aplicação da substância foi realizada lavagem com solução fisiológica (NaCl 0,9%). O
 147 exame oftálmico foi realizado após 1, 24, 48 e 72h da aplicação da substância.

148 As lesões oculares na córnea, íris, conjuntiva e pálpebras foram classificadas em
 149 escores conforme descrito pela OECD 405 (2002) (Tabela 2).

150 **Tabela 2** – Graduação em escores das lesões na córnea, íris, conjuntiva e pálpebras
 151 segundo OECD 405 (2002)

CÓRNEA	Escore
Sem ulceração nem opacidade	0
Áreas de opacidade dispersas ou difusas, detalhes da íris claramente visíveis	1
Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros	2
Áreas mascaradas, detalhe da íris completamente invisível e tamanho da pupila pouco discernível	3
Opaca, íris invisível	4
ÍRIS	Escore
Normal	0
Dobras mais profundas, congestão, edema, hiperemia pericorneana moderada ou vasos injetados (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas), íris ainda reage à luz (reação lenta é positiva)	1
Ausência de reação à luz, hemorragia, destruição do tecido (qualquer uma ou todas)	2
CONJUNTIVA	Escore
Normal	0
Hiperemia de alguns vasos sanguíneos (olhos injetados)	1
Coloração púrpura difusa, vasos sanguíneos dificilmente discerníveis	2
Coloração vermelha difusa	3
PÁLPEBRAS	Escore
Normal	0
Qualquer edema anormal	1
Edema considerável com eversão parcial das pálpebras	2
Edema com as pálpebras parcialmente fechadas	3
Edema com mais da metade das pálpebras fechadas	4

152

153 2.2.3 Teste de sensibilização cutânea

154 Para a avaliação da sensibilização cutânea do óleo essencial de orégano foi
 155 utilizado o protocolo OECD 406 (*Guideline for the testing of chemicals – Skin*
 156 *Sensitisation* adaptado em 17 de julho de 1992). O ensaio para validação da técnica foi
 157 realizado pelo laboratório utilizando 2-mercaptobenzothiazole.

158

159 2.2.3.1 Teste de maximização por Magnusson e Kligman

160 As concentrações (indução e desafio) apropriadas para o teste com o óleo
 161 essencial foram estabelecidas em um ensaio piloto com três animais. A concentração
 162 para a indução foi tolerada sistemicamente, sendo a mais alta dose que causou irritação
 163 leve a moderada (0,38% diluição em água de injeção e 1% de tween 80) e a
 164 concentração usada para o desafio foi a mais alta dose não irritante (0,09% diluição em
 165 água de injeção e 1% de tween 80). Após a padronização das concentrações, os animais

166 foram tricotomizados na região dorsal e, divididos em Grupo Controle (n=10) e Grupo
167 Tratado (n=20). Os animais foram pesados antes do início e ao final do experimento.

168 A indução intradérmica (dorso), indução tópica (flanco) e o desafio (flanco)
169 foram realizados conforme descrito no protocolo OECD 406 (1992) com as
170 concentrações estimadas no ensaio piloto.

171 As avaliações foram realizadas 24h e 48h após cada indução e desafio,
172 classificadas em escores, conforme Magnusson e Kligman (1969) em: 0 = nenhuma
173 mudança visível; 1 = eritema discreto; 2 = eritema moderado; 3 = eritema intenso e
174 edema.

175

176 *2.3 Análise estatística*

177 Os dados referentes ao peso inicial e final dos animais foram apresentados em
178 média \pm erro padrão da média e analisados através do Programa SAS 9.2 (SAS Institute
179 Inc., Cary, NC, USA) com análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas
180 (MIXED procedure) e comparação entre médias pelo teste de Tukey.

181

182 **3 Resultados**

183 *3.1 Teste de irritação/corrosão cutânea aguda*

184 Na avaliação da formulação de *O. vulgare*, os animais não apresentaram sinais
185 clínicos sistêmicos e não tiveram alterações de peso significativas ($p=0,87$), com média
186 de peso inicial de $4,33\text{Kg}\pm 0,30$ e média final $4,41\text{Kg}\pm 0,30$, demonstrando que a
187 utilização da substância não alterou o crescimento dos animais. Somente um animal
188 apresentou eritema pouco perceptível (escore 1) na avaliação das 24h, 48h e 72h com
189 regressão aos 7 dias. Este mesmo animal também apresentou edema pouco perceptível

190 nas 72h após a retirada do curativo com regressão no sétimo dia. Os resultados do
191 ensaio de irritação/corrosão cutânea aguda em coelhos estão descritos na Tabela 3.

192

193 **Tabela 3** – Teste de irritação/corrosão cutânea aguda do óleo essencial de orégano
194 em coelhos albinos, classificação em escores segundo a OECD 404 (2002)

Óleo essencial de Orégano 3%												
Animal	Eritema/escara						Edema					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Coelho 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coelho 2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
Coelho 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

195 T0 – Avaliação imediatamente; T1 – avaliação 1h; T2 – avaliação 24h; T3 –
196 avaliação 48h; T4 – avaliação 72h e T5 – avaliação 7 dias

197 *Todas as avaliações foram realizadas após a retirada do curativo

198

199 3.2 Teste de irritação/corrosão ocular aguda

200 Os animais não apresentaram sinais sistêmicos e diferenças estatisticamente
201 significativas no peso ($p=0,66$) com média de peso inicial de $4,09\pm 0,22$ e média final
202 $3,95\text{Kg}\pm 0,22$. Apenas um animal apresentou sinais de reação ocular inflamatória como,
203 congestão nos vasos episclerais nas avaliações de 24 e 48h, na avaliação das 72h essa
204 reação já havia regredido. Nas avaliações da córnea, conjuntiva e pálpebras, nenhum
205 animal apresentou alterações durante o período experimental.

206

207 3.3 Teste de sensibilização cutânea

208 Nos testes de sensibilização cutânea utilizando óleo essencial de orégano, todos
209 os animais responderam a indução intradérmica e tópica e, nenhum animal respondeu o
210 desafio ao óleo essencial de orégano 0,09%. Não houve diferença estatística entre o
211 peso inicial e final dos animais ($p=0,37$) (Tabela 4).

212

213 **Tabela 4** - Teste de sensibilização cutânea do óleo essencial de orégano em cobaias
 214 segundo OECD 406, escores conforme Magnusson e Kligman e média e erro padrão da
 215 média dos pesos no início e ao final do experimento

Grupos	Indução	Desafio	Nº de animais	Avaliação Desafio		Média pesos ± erro padrão da média (g)	
				24h	48h	Inicial	Final
Controle	Água de injeção + tween 80	Orégano 0,09%	10	0	0	756,3±15,31	740±12,18
Orégano	Orégano 0,38%	Orégano 0,09%	20	0	0	793,3±16,87	776,9±15,64

216

217 **4 Discussão**

218 Reações leves no teste de irritação/corrosão cutânea aguda e no teste de irritação
 219 ocular aguda foram encontradas nestes ensaios para a formulação de orégano 3% (OEO
 220 3%), não havendo sensibilização nas concentrações utilizadas. Estes resultados
 221 demonstram inocuidade do OEO 3%, porém existem inúmeros fatores que interferem
 222 nos resultados dos testes de toxicidade, e dentre estes a sensibilidade intrínscica dos
 223 animais ou suscetibilidade individual (Nogueira e Andrade, 2011; Spinosa et al. 2008),
 224 o que pode explicar o ocorrido em nosso estudo, pois somente um dos animais
 225 apresentou alterações nos testes de irritação/corrosão cutânea e ocular.

226 O veículo utilizado também pode influenciar na produção de lesões, no entanto,
 227 neste estudo provavelmente isto não tenha ocorrido, já que esta loção não iônica é
 228 utilizada para manipulação de diversos produtos da linha dermatológica de uso tópico,
 229 porém os componenetes inertes de uma formulação também podem desencadear reações
 230 em animais muito sensíveis. Além disso, um dos cuidados básicos que se deve ter é com
 231 o pH das formulações, pois este fator pode interferir diretamente nos testes de
 232 irritação/corrosão, sendo que a OEO 3% apresentou pH 6,5. Sabe-se que produtos com
 233 pH $\leq 2,0$ e $\geq 11,5$ devem ser excluídos dos testes *in vivo*, pois são considerados
 234 corrosivos (Brito, 1994).

235 Estudos com relação à toxicidade do óleo essencial de orégano são escassos,
236 entretanto, Cleff et al. (2008) avaliaram a toxicidade pré-clínica do óleo essencial de
237 orégano a 3% administrado diariamente por 30 dias em ratas Wistar, por via oral e intra-
238 vaginal. Os autores não evidenciaram qualquer alteração macroscópica no trato
239 reprodutivo, digestório, fígado, baço e rins e, ainda não foram encontradas alterações
240 nas avaliações clínicas, hematológicas e histopatológicas. O uso do *O. vulgare* em
241 estudos *in vivo* também demonstrou ausência de efeitos adversos em frangos e ratos
242 (Chami et al. 2004; Giannenas et al. 2003). Além disso, o uso de compostos isolados do
243 orégano, eugenol e carvacrol, não causaram efeitos colaterais ou tóxicos em ratos
244 (Chami et al. 2004). Em nosso estudo, de acordo com a interpretação da cromatografia
245 gasosa o composto eugenol não foi utilizado como padrão e, o carvacrol apresentou pico
246 baixo nesta amostra.

247 No presente estudo, a concentração do óleo essencial de orégano foi a mesma
248 utilizada por Cleff et al. (2008), evidenciando que o óleo essencial de orégano na
249 concentração de 3% é um promissor na bioprospecção de produtos naturais.

250 O óleo essencial de orégano 0,09% não apresentou reação de sensibilidade
251 cutânea em cobaias. Contudo, estudo clínico indica que o orégano apresenta
252 alergenicidade e, recomenda-se evitar o consumo excessivo durante a gravidez devido
253 às propriedades sedativas e abortivas (Arcila-Lozano et al. 2004). Além disso, o uso de
254 extrato aquoso de *O. vulgare* a 20% em fêmeas prenhes atrasou o desenvolvimento
255 embrionário, porém o percentual de embriões anormais não foi significativo, sendo os
256 resultados atribuídos ao efeito antimutagênico e antioxidante do extrato (Benavides et
257 al. 2000). Neste caso, seria interessante considerar a continuidade dos experimentos
258 com o OEO 3%, avaliando os efeitos sedativo, abortivo, mutagênico e antioxidante.
259 Estes resultados tornam-se essenciais para validar as propriedades medicinais deste

260 produto que pode ser promissor no tratamento tópico de diversas enfermidades, visto
261 que o conhecimento da toxicidade é um fator de relevância no consumo dos
262 medicamentos, sendo que a atividade biológica versus a toxicidade é um determinante
263 crucial na aplicabilidade terapêutica (Almeida et al. 2003; Melo et al. 2001).

264

265 **5 Conclusão**

266 Com estes resultados, conclui-se que o óleo essencial de orégano 3% causa
267 irritação cutânea e ocular aguda leve, reversível em sete dias. Além disso, nas
268 concentrações testadas, não apresenta sensibilização cutânea.

269

270 **Conflitos de interesse**

271 Os autores declaram que não há conflitos de interesse.

272

273 **Agradecimentos**

274 Os autores agradecem aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e FAPERGS, a
275 BIOENSAIOS e ao LANAGRO/RS.

276

277 **Referências**

278 Arcila-Lozano, C.C., Loarca-Piña, G., Lecona-Urbe, S., Mejía, E.G., 2004. El orégano:
279 propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Arch. latinoam.
280 nutr. 54, 100-111.

281 Benavides, V., 2000. Evaluación toxicológica preliminar de Ruta graveolens, Origanum
282 vulgare y Persea americana sobre embriones preimplantacionales de ratón. Ver. Peru.
283 Biol. 7, 86-88.

- 284 Magnusson, B., Kligman, A.M., 1969. The identification of contact allergens by animal
285 assay. The guinea pig maximization test. *J. Invest. Derm.* 52, 268–276.
- 286 Brasil 2004. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução
287 no. 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de
288 medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.
- 289 Brito, A.S., 1994. Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo*, 1ª edição Editora
290 Unicamp, Campinas/SP.
- 291 Chami, N., Chami, F., Bennis, S., Trouillas, J. Remmal, A., 2004. Antifungal Treatment
292 With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. *Braz. J.*
293 *Infect. Dis.* 8, 217-226.
- 294 Cleff, M.B., Meinerz, A.R.M., Xavier, M.O., Schuch, L.F., Meireles, M.C.A.,
295 Rodrigues, M.R.A., Mello, J.R.B., 2010. *In vitro* susceptibility of *Origanum vulgare*
296 essential oil against *Candida* species. *Braz. J. Microbiol.* 41, 116-123.
- 297 Cleff, M.B., Meinerz, A.R., Sallis, E.V., Antunes, T.A., Mattei, A., Rodrigues, M.R.,
298 Meireles, M.C.A., Mello, J.R.B., 2008. Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do
299 Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar. *Acta Farm.*
300 *Bonaerense.* 27, 704-709.
- 301 Draize, J.H., Woodard, G., Calvery, H.O., 1944. Method for the study of irritation and
302 toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. *J.*
303 *Pharmacol. Exp. Ther.* 82, 337-390.
- 304 Duarte, M.C.T., Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L., Delarmelina, C., 2005.
305 Anti-*Candida* activity of brasilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97, 305-311.
- 306 Brasil., 2011. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da
307 Farmacopéia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa,
308 126p.

- 309 Giannenas, I., Florou-Paneri, P., Papazahariadou, M., Christaki, E., Botsoglou, N.A.,
310 Spais, A.B., 2003. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on
311 performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. Arch. Anim.
312 Nutr. 57, 1477-2817.
- 313 Khan, A., Bashir, S., Khan, S.R., Gilani, A.H., 2011. Antiurolithic activity of *Origanum*
314 *vulgare* is mediated through multiple pathways. Complement. Alt. Med. 11, 96.
- 315 Lambert, R.J.W., Skandamis, P.N., Coote, P.J., 2001. A Study of the minimum
316 inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and
317 carvacrol. J. Appl. Microbiol. 91, 453-462.
- 318 Lorenzi, H., Matos, F.J.A., 2002. Plantas Mediciniais no Brasil: Nativas e Exóticas.
319 Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA,
- 320 Manohar, V., Ingram, C., Gray, J., Talpur, N.A., Bagghi, D., Preuss, H.G., 2001.
321 Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. Mol. Cell. Biochem.
322 228, 111-117.
- 323 Melo, P.S., Dura'n, N., Haun, M., 2001. Cytotoxicity of derivatives from
324 dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. Toxicol. 159, 135–141.
- 325 Moreira, A.C.P., Lima, E.O., Wanderley, P.A., Carmo, E.S., Souza, E.L., 2010.
326 Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves
327 essential oil against *Aspergillus* species. Braz. J. Microbiol. 41, 28-33.
- 328 Nogueira, R.M.B., Andrade, S.F., 2011. Manual de Toxicologia Veterinária. 1ª ediação,
329 Editora Roca.
- 330 OECD Guideline for the testing of chemicals 404 - Acute Dermal Irritation/Corrosion.
331 Adopted: 24th April 2002.
- 332 OECD Guideline for the testing of chemicals 405 - Acute Eye Irritation/Corrosion.
333 Adopted: 24th April 2002.

- 334 OECD *Guideline for the testing of chemicals 406– Skin Sensitisation* adaptado em 17 de
335 julho de 1992.
- 336 Righi, D.A., Spinosa, H.S., Palermo-Neto, J., 2008. Avaliação da toxicidade, in:
337 Spinosa, H.S., Górnaiak, S.L., Palermo-Neto, J. (Eds.), *Toxicologia aplicada à Medicina*
338 *Veterinária*, Editora Manole, Barueri – São Paulo, pp.41-67.
- 339 Souza, E.L., Stamford, T.L.M., Lima, E.O., Trajano, V.N., Barbosa-Filho, J.M., 2005.
340 Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de
341 compostos antimicrobianos. *Rev. Hig. Alim.* 19, 40-45.
- 342 Veiga JR, V. F., Pinto, A.C., Maciel, M.A.M., 2005. Plantas Medicinais: Cura segura?.
343 *Química Nova.* 28, 519-528.
- 344

4.4 Artigo 4

Irritação/corrosão cutânea e ocular dos óleos essenciais de *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*

Santin, R.; Madrid, I.M.; Matos, C.B.; Mello, F.B.; Cleff, M.B.; Mello, J.R.B.

Artigo formatado sob normas da Revista Anais da Academia Brasileira de Ciências

**Irritação/corrosão cutânea e ocular dos óleos essenciais de *Origanum majorana* e
*Rosmarinus officinalis***

Rosema Santin^{1,*}, Isabel Martins Madrid², Caroline Bohnen de Matos³, Fernanda Bastos
de Mello⁴, Cleff, Marlete Brum⁵, João Roberto Braga de Mello⁶

¹*Msc.*, Doutoranda - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias -
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

²*Dsc.*, Médica Veterinária – Prefeitura Municipal de Pelotas/RS

³Médica Veterinária, Mestranda – Programa de Pós-Graduação em Veterinária –
Universidade Federal de Pelotas

⁴Profª Adjunto – Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

⁵Profº Associado – Departamento de Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária
- Universidade Federal de Pelotas

⁶Profª Adjunto – Departamento de Clínicas Veterinária – Faculdade de Veterinária -
Universidade Federal de Pelotas

⁷Profº Associado – Departamento de Farmacologia – Instituto de Ciências Básicas da
Saúde – Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Palavras-chave: aguda, alecrim, coelhos, manjerona, *in vivo*, plantas medicinais

Irritação cutânea e ocular de manjerona e alecrim

Artigo Científico

*Autor para correspondência

Endereço: Rua Benjamin Furlan, 120 apto 401 – Bairro São Miguel – Concórdia/SC –
CEP 89700-000

Email: seminhavet@yahoo.com.br

Tel.: (49) 88709339

Resumo

Objetivou-se avaliar a irritação/corrosão cutânea e ocular aguda dos óleos essenciais de *Origanum majorana* (manjerona) 6% e *Rosmarinus officinalis* (alecrim) 24%. Os testes foram realizados de acordo com a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), conforme OECD 404 (2002) para irritação/corrosão cutânea aguda e OECD 405 (2002) para irritação/corrosão ocular aguda. Nos animais experimentais tratados com formulação contendo óleo essencial de manjerona 6% observou-se que nas 24, 48 e 72h todos os animais apresentaram eritema pouco perceptível, regredindo em até sete dias. Quanto ao edema, dois animais apresentaram edema pouco perceptível nas 24 e 48h com remissão nas 72h e um animal permaneceu sem alterações. No grupo controle foi observado eritema pouco perceptível nas 24 e 48h. Em dois animais do grupo alecrim 24% as lesões de eritema/escara regrediram em 21 dias. O edema regrediu em sete dias. O óleo essencial de manjerona 6% causa irritação cutânea e ocular aguda leve, reversível em sete dias. Porém, o óleo essencial de alecrim 24% causa irritação cutânea e ocular aguda moderada.

Introdução

Desde os primórdios da humanidade, as plantas medicinais constituem fonte imediata e viável de medicamentos para tratamento de enfermidades (Dorman et al. 2000, Simões et al. 2003, Souza et al. 2005), uma vez que apresentam inúmeras propriedades como, antifúngica, antiviral, antibacteriana, anti-inflamatória, antioxidante entre outras (Baratta et al. 1998, Buffon et al. 2001, Cleff et al. 2010).

Apesar do crescente interesse em utilizar os produtos naturais, em especial óleos essenciais, ainda são poucos estudos que disponibilizam informações referentes à toxicidade que estes podem desencadear, sendo que grande parte dos extratos e/ou

fitoterápicos atualmente utilizados, não tem o seu perfil tóxico bem conhecido ou definido (Capasso et al. 2000, Veiga JR, 2008).

Neste sentido, a validação científica dos produtos naturais é essencial para o uso como medicamento alternativo (Simões et al. 2003), sendo que na legislação brasileira, é considerado critério obrigatório para o registro de fitoterápicos a comprovação da sua segurança e eficácia.

Diante do exposto e, considerando a importância dos medicamentos naturais na atualidade, há necessidade de caracterizar os padrões de toxicidade de óleos essenciais, principalmente pelo fato de tratar-se de uma mistura complexa de compostos apolares altamente lipossolúveis (Simões et al. 2003), além de apresentarem grande potencial como antimicrobiano (Cleff et al. 2008, Cleff et al. 2010, Marino et al. 2001, Oliveira et al. 2009, Packer e Luz 2009, Wang et al. 2012).

Neste contexto, objetivou-se avaliar a irritação/corrosão cutânea e ocular aguda dos óleos essenciais de *Origanum majorana* 6% e *Rosmarinus officinalis* 24%.

Material e Métodos

Óleos essenciais

O alecrim e manjerona foram adquiridos de distribuidor comercial (Luar Sul[®]) com certificação de qualidade e origem. As folhas secas foram encaminhadas ao Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) para extração dos óleos essenciais através de hidrodestilação em aparelho Clevenger e cromatografia gasosa, na qual foram identificados como compostos majoritários da manjerona timol, 4-terpineol e p-cimeno e, do alecrim α -pineno e 1,8-cineol. Após, os óleos essenciais foram encaminhados à farmácia de manipulação veterinária para preparo das formulações nas concentrações de 6% e 24%

para manjerona e alecrim, respectivamente (duas vezes a maior concentração encontrada nos testes de ação antifúngica *in vitro*). A base utilizada foi loção não iônica e o pH de ambas formulações foi 6,0.

Testes de toxicidade pré-clínica in vivo

Os testes de toxicidade *in vivo* foram realizados de acordo com a *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD), conforme OECD 404 (Guideline for the testing of chemicals - Acute Dermal Irritation/Corrosion adaptado em 24 de abril de 2002) e OECD 405 (*Guideline for the testing of chemicals - Acute Eye Irritation/Corrosion* adaptado em 24 de abril de 2002). O projeto obteve parecer favorável da Comissão de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UFPel sob o número 2432. Para os testes de irritação/corrosão cutânea e ocular aguda foram utilizados 18 coelhos albinos (*Oryctolagus cuniculus*), Nova Zelândia, machos, adultos e hípidos. As avaliações foram realizadas por três observadores simultaneamente.

Durante a realização do experimento os animais ficaram alojados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPel) e Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório – CREAL/UFRGS em gaiolas individuais, mantidos em condições controladas de umidade (30-70%) e temperatura (17-23°C), ciclo de claro e escuro de 12 horas, com dieta apropriada para a espécie e água *ad libitum*.

Após o período experimental, todos os animais foram eutanasiados conforme Resolução nº 1000, de 12 de maio de 2012 do CFMV.

Teste de irritação/corrosão cutânea aguda

Para o teste de irritação/corrosão cutânea aguda foram utilizados nove coelhos, divididos aleatoriamente em três grupos: GRUPO *Origanum majorana* 6% (OM) n=3; GRUPO *Rosmarinus officinalis* 24% (RO) n=3 e GRUPO Veículo (loção não iônica) (GV) n=3. Todos os animais foram pesados no início e ao final do experimento e, para cada animal as áreas não tratadas serviram como controle (lado oposto).

A primeira aplicação da substância, em dose única, foi em apenas um animal de cada grupo experimental, após ausência de irritação intensa foram utilizados mais dois animais em cada grupo. Vinte e quatro horas antes do início do teste foi realizada tricotomia e, posteriormente aplicado 0,5mL das substâncias testes em uma área de aproximadamente 6cm² que foi coberta com gaze e fita não-irritante por 4h, após este período, a área foi lavada com solução fisiológica. As avaliações foram realizadas imediatamente após a remoção das substâncias e, em 1, 24, 48 e 72 horas, 7, 14 e 21 dias. Os animais foram examinados e avaliados quanto à formação de eritema/escara e edema e classificados em escores de 0 a 4, segundo protocolo OECD 404 (2002) (Tabela 1).

Tabela 1 – Classificação dos escores quanto à formação de eritema/escara e edema, conforme OECD 404 (2002)

Formação de eritema e escaras	Escore
Sem eritema	0
Eritema muito leve (pouco perceptível)	1
Eritema bem definido	2
Eritema moderado a severo	3
Eritema grave severo a formação de escaras	4
Formação de edema	Escore
Sem edema	0
Edema muito leve (pouco perceptível)	1
Edema leve (bordos bem definidos)	2
Edema moderado (aumento de aproximadamente 1mm)	3
Edema severo (aumento superior a 1mm, visível além da área de exposição)	4

Teste de irritação/corrosão ocular aguda

Para o teste os animais experimentais foram aleatoriamente divididos em três grupos, com três coelhos cada, sendo GRUPO *Origanum majorana* 6% (OM), GRUPO *Rosmarinus officinalis* 24% (RO) e GRUPO *Veículo* (loção não iônica) (GV), este ensaio foi desenvolvido após o ensaio de irritação/corrosão cutânea. Todos os animais foram pesados no início e ao final do experimento. Quinze minutos antes da aplicação das substâncias foi instilado anestésico local nos olhos. Foram administrados 0,1mL das formulações contendo os óleos essenciais no saco conjuntival, em dose única, em um dos olhos no coelho nº 1 de cada grupo, enquanto o olho do lado oposto foi considerado controle. Posteriormente, o mesmo procedimento foi realizado nos animais 2 e 3 de cada grupo.

Os animais passaram por exame físico e oftálmico 24h antes do início do experimento e durante as avaliações, sendo utilizada fluoresceína em todos os momentos, exceto no exame após 1h da aplicação. O exame oftálmico foi realizado após 1, 24, 48, 72h, 7 dias, 14 dias e 21 dias da aplicação das substâncias para verificar a presença e classificar as lesões da córnea, íris, conjuntiva e pálpebras em escores segundo OECD 405 (2002) e classificar como reversíveis ou irreversíveis (Tabela 2).

Tabela 2 – Graduação em escores das lesões na córnea, íris, conjuntiva e pálpebras segundo OECD 405 (2002)

CÓRNEA	Escore
Sem ulceração nem opacidade	0
Áreas de opacidade dispersas ou difusas, detalhes da íris claramente visíveis	1
Áreas translúcidas facilmente discerníveis, detalhes da íris ligeiramente obscuros	2
Áreas mascaradas, detalhe da íris completamente invisível e tamanho da pupila pouco discernível	3
Opaca, íris invisível	4
ÍRIS	Escore
Normal	0
Dobras mais profundas, congestão, edema, hiperemia pericorneana moderada ou vasos injetados (qualquer uma ou todas essas alterações ou a combinação de algumas delas), íris ainda reage à luz (reação lenta é positiva)	1
Ausência de reação à luz, hemorragia, destruição do tecido (qualquer uma ou todas)	2
CONJUNTIVA	Escore
Normal	0
Hiperemia de alguns vasos sanguíneos (olhos injetados)	1
Coloração púrpura difusa, vasos sanguíneos dificilmente discerníveis	2
Coloração vermelha difusa	3
PÁLPEBRAS	Escore
Normal	0
Qualquer edema anormal	1
Edema considerável com eversão parcial das pálpebras	2
Edema com as pálpebras parcialmente fechadas	3
Edema com mais da metade das pálpebras fechadas	4

Análise estatística

Os dados referentes ao peso inicial e final dos animais foram apresentados em média \pm erro padrão da média e analisados através do Programa SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) com análise de variância (ANOVA) por medidas repetidas (MIXED procedure) e a comparação entre médias pelo teste de Tukey.

Resultados

Teste de irritação/corrosão cutânea aguda

Nos animais do grupo manjerona 6% (OM) não houve diferença significativa ($p=0,25$) entre a média do peso inicial e final dos animais. A média e o erro padrão da média do peso inicial dos animais foi $2,84\text{Kg} \pm 0,15$ e do peso final $3,13 \pm 0,15$.

Nos animais tratados com a formulação contendo óleo essencial de manjerona 6% foi possível observar que, imediatamente e 1h após a retirada do curativo, nenhum

animal apresentava eritema e edema. Já nas 24, 48 e 72h todos animais do grupo manjerona apresentaram eritema pouco perceptível, regredindo em 7dias. Quanto à formação de edema, dois animais apresentaram edema pouco perceptível nas avaliações 24 e 48h com remissão total nas 72h e um animal permaneceu sem alterações, nos controles também foi observado eritema pouco perceptível nas 24 e 48h. Os resultados do teste de irritação/corrosão cutânea do óleo essencial de manjerona 6% estão dispostos na tabela 3.

Tabela 3 – Escores obtidos nos diferentes tempos de avaliação no teste de irritação/corrosão cutânea aguda do óleo essencial de manjerona 6% segundo OECD 404 (2002)

Óleo essencial de Manjerona 6%												
Animal	Eritema/escara						Edema					
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T0	T1	T2	T3	T4	T5
Coelho 1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0
Coelho 2	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
Coelho 3	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0

T0 – Avaliação imediatamente; T1 – avaliação 1h; T2 – avaliação 24h; T3 – avaliação 48h; T4 – avaliação 72h e T5 – avaliação 7 dias.

*Todas as avaliações foram realizadas após a retirada do curativo.

Nos animais do grupo alecrim 24% (RO) não houve diferença significativa ($p=0,79$) entre a média do peso inicial e final dos animais. A média e o erro padrão da média deste grupo foi de 4,18Kg \pm 0,20 no peso inicial e 4,10 \pm 0,20 no peso final.

As lesões de eritema/escara em dois animais do grupo alecrim 24%, regrediram totalmente apenas aos 21 dias. Já com relação ao edema, as lesões regrediram no sétimo dia de avaliação (Tabela 4).

Tabela 4 – Escores obtidos nos diferentes tempos de avaliação no teste de irritação/corrosão cutânea aguda do óleo essencial de alecrim 24% segundo OECD 404 (2002)

Óleo essencial de Alecrim 24%																
Animal	Eritema/escara								Edema							
	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7
Coelho 1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	2	1	0	0
Coelho 2	0	0	2	2	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coelho 3	0	0	0	2	2	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0

T0 – Avaliação imediatamente; T1 – avaliação 1h; T2 – avaliação 24h; T3 – avaliação 48h; T4 – avaliação 72h; T5 – avaliação 7 dias; T6 - avaliação 14 dias e T7 – avaliação 21 dias.

*Todas as avaliações foram realizadas após a retirada do curativo.

Dos animais do grupo tratado somente com veículo, apenas um animal apresentou para eritema/escara pouco perceptível (score 1) nas 24 e 48h.

Teste de irritação/corrosão ocular aguda

Nos animais do grupo manjerona 6% (OM) não houve diferença significativa ($p=0,51$) entre a média dos pesos inicial e final dos animais. A média e o erro padrão da média foram peso inicial $3,13\text{Kg} \pm 0,12$ e peso final $3,25 \pm 0,12$.

No teste de irritação/corrosão ocular utilizando a formulação contendo óleo essencial de manjerona 6% foi possível observar lesões leves que foram reversíveis em menos de 72h (Tabela 5).

Tabela 5 – Escores de acordo com os tempos de avaliação, após o ensaio de irritação/corrosão ocular em coelhos albinos tratados com formulação contendo óleo essencial de manjerona 6%, conforme OECD 405 (2002)

Avaliações	Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3
Córnea			
1h	0	0	0
24h	0	1	0
48h	0	0	0
72h	0	0	0
Íris			
1h	1	1	1
24h	0	0	0
48h	0	0	0
72h	0	0	0
Conjuntiva			
1h	1	1	0
24h	0	0	0
48h	0	0	0
72h	0	0	0
Pálpebras			
1h	0	0	0
24h	0	0	0
48h	0	0	0
72h	0	0	0

Nos animais do grupo alecrim 24% (OM) não houve diferença significativa ($p=0,68$) entre a média dos pesos inicial e final dos animais. A média e o erro padrão da média foram peso inicial $4,37\text{Kg} \pm 0,30$ e peso final $4,17 \pm 0,30$.

Já neste mesmo teste, utilizando a formulação com óleo essencial de alecrim 24%, pode-se observar que as lesões foram mais intensas e necessitaram de até 21 dias para regressão total (Tabela 6).

Tabela 6 – Escores de acordo com os tempos de avaliação, após o ensaio de irritação/corrosão ocular em coelhos albinos tratados com formulação contendo óleo essencial de alecrim 24%, conforme OECD 405 (2002)

Avaliações	Coelho 1	Coelho 2	Coelho 3
Córnea			
1h	0	0	0
24h	1	0	2
48h	0	0	1
72h	0	0	1
7 dias	0	0	0
14 dias	0	0	0
21 dias	0	0	0
Íris			
1h	1	1	1
24h	1	1	1
48h	1	1	1
72h	0	0	1
7 dias	0	0	1
14 dias	0	0	0
21 dias	0	0	0
Conjuntiva			
1h	0	0	1
24h	1	1	1
48h	1	0	1
72h	1	0	1
7 dias	1	0	1
14 dias	0	0	0
21 dias	0	0	0
Pálpebras			
1h	1	0	1
24h	1	1	1
48h	1	0	1
72h	1	0	1
7 dias	0	0	0
14 dias	0	0	0
21 dias	0	0	0

Discussão

Os testes de irritação/corrosão cutânea e ocular aguda são de extrema importância quando se pretende avaliar o potencial de novos produtos ou formulações para uso tópico. Este teste evidencia a capacidade de lesão cutânea e ocular em contato com esta região em uma única aplicação (OECD, 2002). De acordo com a ANVISA (Agência

Nacional de Vigilância Sanitária), estes são testes obrigatórios nas etapas pré-clínicas de desenvolvimento de um produto.

Neste estudo, as formulações foram utilizadas por estarem dentro dos padrões permitidos (pH 6,0), pois é descrito que produtos com $\text{pH} \leq 2,0$ e $\geq 11,5$ são excluídos dos testes *in vivo*, pois produzem reações de corrosão tanto na pele como no olho (Brito 1994, OECD 2012).

Na realização do teste de irritação/corrosão cutânea os controles referentes à formulação do óleo essencial de manjerona 6% e também um animal do grupo veículo apresentaram reações leves em 24 e 48h, possivelmente pela realização da tricotomia, que também pode justificar a presença do eritema por um período maior nos animais tratados, pois possivelmente esta estimula a vasodilatação, logo aumenta a permeabilidade vascular e conseqüentemente a maior absorção do produto. Além disso, a utilização de lâmina para realização da tricotomia pode ter estimulado uma resposta inflamatória mais exacerbada em alguns animais, manifestada como eritema e edema já que os coelhos apresentam uma grande sensibilidade cutânea, sendo por isso, utilizados como modelos para estes testes (OECD, 2002). Como somente um animal apresentou reação no grupo manjerona e um animal do grupo alecrim apresentou reações mais intensas que os outros dois, outra possibilidade é a sensibilidades ou suscetibilidade individual, já que alguns indivíduos respondem de forma diferente ou mais exacerbada (Righi et al. 2008).

E ainda, a extrapolação dos resultados dos estudos de irritação/corrosão na pele em animais de laboratório para os seres humanos é válida apenas num grau limitado. Em muitos casos, o coelho albino é mais sensível do que os humanos a substâncias irritantes ou corrosivas oculares (OECD, 2012).

Os animais tratados com óleo essencial de manjerona 6% no teste de irritação/corrosão cutânea e ocular aguda tiveram reações leves que regrediram em 48-72h, demonstrando que este pode ser considerado como irritante leve. Embora existam trabalhos com relação às propriedades antimicrobianas do óleo essencial de manjerona (BUSATTA et al. 2008; OLIVEIRA et al. 2009), ainda nota-se uma carência de estudos para comprovar cientificamente os efeitos deste óleo como antimicrobiano, antiviral, antioxidante e, principalmente estudos toxicológicos em modelos experimentais.

Em nosso estudo, o óleo essencial de alecrim 24% foi considerado irritante moderado, com reversão dos sinais apenas nos 21 dias, corroborando com autores que referem a utilização do alecrim controlada em gestantes e, ainda que na forma de essência pode ser irritante para a pele. Além disso, este óleo pode causar alterações no sono e a ingestão de doses elevadas, provoca irritações gastrintestinais e até mesmo nefrite. Também já foi descrita reações de hipersensibilidade quando utilizado este extrato vegetal (Cardoso et al. 2000).

O óleo essencial de alecrim 24% produziu irritação moderada com apenas uma aplicação, estes dados concordam com os achados de Mueller (2011) que observou irritação intensa na orelha externa hígida de ratos Wistar tratados diariamente por 7 dias com óleo essencial de alecrim 25%. Por outro lado, em concentrações menores poderia ser evidenciada reação leve ou ausência de reações, pois toda substância é um agente potencialmente tóxico dependendo das condições de exposição, incluindo dose administrada ou absorvida (Castro 1993, Righi et al. 2008). Ainda, deve-se considerar que no óleo essencial estão presentes tanto substâncias potencialmente terapêuticas como terpenos, bem como substâncias indesejadas ou tóxicas (Simões et al. 2003).

Ao analisarmos as lesões de eritema e edema nos coelhos tratados com alecrim, pode-se perceber que estas lesões foram de maior intensidade que as encontradas no

grupo manjerona, talvez isto possa ter ocorrido pela concentração mais elevada do óleo essencial de alecrim, bem como a presença de diferentes compostos químicos entre eles.

Para Veiga Jr et al. (2005), o risco maior de *R. officinalis* está relacionado ao aumento da motilidade uterina causando aborto, embora Mengue et al. (2001) não consideram o alecrim como potencialmente tóxicos na gestação.

A comprovação da eficácia do óleo essencial de alecrim e manjerona vem sendo difundida, especialmente por apresentarem atividade *in vitro* frente a diferentes microrganismos, como bactérias e fungos (Marino et al. 2001, Oliveira et al. 2009, Packer e Luz 2009, Costa et al. 2009, Wang et al. 2012). Entretanto, observa-se que poucos testes de toxicidade tem sido desenvolvidos, o que pode representar riscos para a saúde humana e animal, principalmente pelo uso indiscriminado destes. Estudos de toxicidade aguda, subaguda e crônica, reprodutivos e mutagênicos devem ser conduzidos a fim de evidenciar os riscos e cuidados que devem ser tomados com a utilização destes óleos ou formulações contendo diferentes concentrações.

Conclusão

O óleo essencial de manjerona 6% causa irritação cutânea e ocular aguda leve, reversível em sete dias. Porém, o óleo essencial de alecrim 24% causa irritação cutânea e ocular aguda moderada.

Agradecimentos

Os autores agradecem aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e FAPERGS, a BIOENSAIOS e ao LANAGRO/RS.

Referências

BARATTA MT, DORMAN HJD, DEANS SG, BIONDI DM AND RUBERTO G. 1998. Chemical composition antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. J Essent Oil Res 10(6): 618-627.

BRITO, A.S. 1994. Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo*, Editora Unicamp, Campinas/SP, 122 p.

BUFFON MCM, LIMA MLC, GALARDA I, COGO L. 2001. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoarea* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. Rev Visao Academ 2(1): 31-38.

CAPASSO R, IZZO AA, PINTO L, BIFULCO T, VITOBELLO C AND MASCOLO N. 2000. Phytotherapy and quality of herbal medicines. Fitoterapia 71: 58-65.

CARDOSO M, GAVILANES ML, MARQUES MCS, SHAN AYKV, SANTOS BR, OLIVEIRA ACB, BERTOLUCCI VKS AND PINTO APS. 2000. Óleos Essenciais, Editora UFLA, Lavras/MG, 42 p.

CASTRO JA. 1993. Toxicologia basica mecanismos de toxicidade y sus aplicaciones. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana 2:197-206.

CLEFF M B, MEINERZ AR, FARIA RO, XAVIER MO, SANTIN R, NASCENTE OS, RODRIGUES MR AND MEIRELES MCA. 2010. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. Arq Bras Med Vet e Zootec 62(5): 1291-1294.

CLEFF MB, SILVA GM, MEINERZ ARM, MADRID IM, MARTINS AA, FONSECA AO, NASCENTE PS, MEIRELES MCA AND MELLO JRB. 2007. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. Vet e Zootec 14(2): 164-168.

CLEFF MB, MEINERZ ARM, SCHUCH LFD, RODRIGUES MRA, MEIRELES MCA AND MELLO JRB. 2008. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. Arq Bras Med Vet Zootec 60(2): 513-516.

COSTA ACBP, PEREIRA CA, FREIRE F, JUNQUEIRA JC AND JORGE AOC. 2009. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. Rev Odontol UNESP 38(2): 111-116.

DORMAN HJ, SURAI P AND DEANS SG. 2000. *In vitro* antioxidant activity of a plant essential oils and phytoconstituents. J Essent Oil Res 12(2): 241-248.

DRAIZE JH, WOODARD G AND CALVERY HO. 1944. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. J Pharm Exp Ther 82: 337-390.

MARINO M, BERSANI C AND COMI G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. Intern J Food Microbiol 67: 187-195.

OECD *Guideline for the testing of chemicals 404 - Acute Dermal Irritation/Corrosion*. Adopted: 24th April 2002.

OECD *Guideline for the testing of chemicals 405 - Acute Eye Irritation/Corrosion*. Adopted: 24th April 2002.

OECD *Guideline for the testing of chemicals 405 - Acute Eye Irritation/Corrosion*. Adopted: 2 October, 2012.

OLIVEIRA JLTM, DINIZ MFM, LIMA EO, SOUZA EL, TRAJANO VN AND SANTOS BHC. 2009. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in Inhibiting the Growth of Bacterial Strains Isolated from the Patients with Conjunctivitis. Braz Arch Biol Technol 52(1): 45-50.

PACKER JF AND LUZ MMS. 2007. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn* 17(1): 102-107.

RIGHI DA, SPINOSA HS AND PALERMO-NETO J. 2008. Avaliação da toxicidade. In: SPINOSA HS et al. (Eds.), *Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária*, São Paulo, Editora Manole, Barueri – São Paulo, p. 41-67.

SIMÕES CMO, SCHENKEL EP, GOSMSNN G, MELLO JCP, MENTZ LA AND PETROVICK PR. 2003. *Farmacognosia*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 1102 p.

SOUZA EL, STAMFORD TLM, LIMA EO, TRAJANO VN AND BARBOSA-FILHO JM. 2005. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. *Rev Hig Alim* 19(132): 40-45.

VEIGA JR VF, PINTO AC AND MACIEL MAM. 2005. Plantas Medicinais: Cura segura?. *Química Nova* 28(3): 519-528.

VEIGA JR VF. 2008. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev Bras Farmacogn* 18: 308-313.

5 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos permitem concluir que:

- Os compostos majoritários nas amostras estudadas do óleo essencial de orégano são timol, α -terpineno e 4-terpineol, da manjerona são timol, 4-terpineol e p-cimeno e, do alecrim α -pineno e 1,8 cineol;
- A levedura *M. pachydermatis* é sensível ao óleo essencial de orégano mesmo em concentrações baixas. Desta maneira, o óleo essencial de orégano apresenta-se como promissor no tratamento das otites e dermatites fúngicas na clínica de pequenos animais;
- Os óleos essenciais de *O. majorana* e *R. officinalis* possuem atividade antifúngica *in vitro* frente a leveduras isoladas de animais hígidos e com otite.
- A formulação contendo óleo essencial de orégano 3% causa irritação cutânea e ocular aguda leve, reversível em sete dias. Além disso, nas concentrações testadas, não apresenta sensibilização cutânea;
- A formulação contendo óleo essencial de manjerona 6% causa irritação cutânea e ocular aguda leve, reversível em sete dias. Porém, a formulação com óleo essencial de alecrim 24% causa irritação cutânea e ocular aguda moderada.

REFERÊNCIAS

- ALVES, P. M.; Leite, P. H. A. S.; Pereira, J. V.; Pereira, L. F.; Pereira, M. S. V.; Higino, J.; Lima, E. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn.(goiabeira) sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. Revista **Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.192-196, 2006.
- AMIN, A.; HAMZA, A. A. Hepatoprotective effects of *Hibiscus*, *Rosmarinus* and *Salvia* on azathioprine-induced toxicity in rats. **Life Sciences**, v.77, p.266–278, 2005.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CERETI, E.; BARILE, D.; COISSON, J. D.; ARLORIO M.; DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L.**Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, n.11, p.3530-5, 2004.
- ARAÚJO, J. C. L. V. **Perfil de sensibilidade de microrganismos oportunistas de origem clínica e ambiental a óleos essenciais**. 2003. 77f. Dissertação de Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba.
- ARCILA-LOZANO, C. C.; LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; MEJÍA, E.G. El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v.54, p.100-111, 2004.
- ASHBEE, H. R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v.45, p.287-303, 2007.
- 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.
- BENAVIDES, V et al. Evaluación toxicológica preliminar de Ruta graveolens, Origanum vulgare y Persea americana sobre embriones preimplantacionales de ratón. **Revista Peruana de Biología**, v.7, p.86-88, 2000.
- BIZZO, H. R.; HVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v.32, n.3, p.588-594, 2009.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011, 126p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no. 90 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o Guia para os estudos de toxicidade de medicamentos fitoterápicos. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 18 mar. 2004.

BRITO, A. S. Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo*, 1ª edição, Campinas/SP, Editora Unicamp, 1994, p.122.

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C.; GALARDA, I.; COGO, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoaria* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo “*in vitro*”. **Revista Visão Acadêmica**, v.2, n.1, p.31-38, 2001.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v.36, 162-167, 2003.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 110f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões - URI, Erechim/RS.

BUSATTA, C.; VIDAL, R. S.; POPIOLSKI, A. S.; MOSSI, A. J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M. R. A.; CORAZZA, F. C.; CORAZZA, M. L.; OLIVEIRA, V. J.; CANSIAN, R. L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v.25, p.207–211, 2008.

CABAÑES, F. J.; VEJA, S.; CASTELL, G. *Malassezia cuniculi* sp. nov., a novel yeast species isolated from rabbit skin. **Medical Mycoogy**, n.49, p.40–48, 2011.

CAMPBELL, J. J.; COYNER, K. S.; RANKIN, S. C.; LEWIS, T. P. ; SCHICK, A. E.; SHUMAKER, A. K. Evaluation of fungal flora in normal and diseased canine ears. **Veterinary Dermatology**, v.21, p.619-25, 2010.

CANNIZZO, F. T.; ERASO, E.; EZKURRA, P. A.; VILLAR-VIDAL, M.; BOLLO, E.; CASTELLÁ, G.; CABAÑES, F. J.; VIDOTTO, V.; QUINDÓS, G. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Medical Mycology**, v.45, p.357-361, 2007.

CAPASSO, R.; IZZO, A. A.; PINTO, L.; BIFULCO, T.; VITOBELLO, C.; MASCOLO, N. Phytotherapy and quality of herbal medicines. **Fitoterapia**, v.71, p.58-65, 2000.

CARDOSO, M.; GAVILANES, M. L.; MARQUES, M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B.; BERTOLUCCI, V. K. S.; PINTO, A. P. S. **Óleos Essenciais**. Lavras: Editora UFLA, 2000. 42 p.

CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. C. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**, v.142, p.432–434, 2010.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.314-319, 2008.

CASTRO, J.A. Toxicologia basica mecanismos de toxicidade y sus aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, v.2, p.197-206, 1993.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas Medicinaiis, condimentares e aromáticas: Descrição e Cultivo**. Guaíba : Livraria e Editora Agropecuária, 1995. 196p.

CELIKTAS, O.Y.; KOCABAS, E. E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v.1, n.100, p.553-9, 2007.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal Treatment With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. **Brazilian Journal Infection Disease**, v.8, p.217-226, 2004.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.O.; XAVIER, M.O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P.S.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010a.

CLEFF, M.B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp.** 2008. 114f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A. R. M.; SCHUCH, L. F. D.; RODRIGUES, M. R. A.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.60, n.2, p.513-516, 2008a.

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.14, n.2, p.164-8, 2007.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R.; SALLIS, E. V.; ANTUNES, T. A.; MATTEI, A. S.; RODRIGUES, M. R.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v.27, p.704-709, 2008b.

CLEFF, M. B.; MEINERZ, A. R. M.; XAVIER, M. O.; SCHUCH, L. F.; MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, J. R. B. *In vitro* susceptibility of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.116-123, 2010b.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista brasileira de Plantas Medicinaiis**, v.14, n.1, 2012.

CLEFF, M.B.; SANTIN, R. Homeopatia e fitoterapia. In: NOBRE, M.O.; MUELLER, E. N.; CAMPELLO-FÉLIX, A. O.; TILLMANN, M. T. **Tópicos em criação e clínica de cães**. Pelotas : Editora e Gráfica Universitária da UFPel, 2009. 178p.

CLSI Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts - M27-A3**. Approved Standard-Third Edition, 2008.

COSTA, A. C. B. P.; PEREIRA, C. A.; FREIRE, F.; JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C. Atividade antifúngica dos extratos glicólicos de *Rosmarinus officinalis* Linn. e *Syzygium cumini* Linn. sobre cepas clínicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, n.2, p.111-116, 2009.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS Analysis of Essential Oils from Some Greek Aromatic Plants and Their Fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.2576-2581, 2000.

DORMAN, H. J.; SURAI, P.; 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.

DRAIZE, J. H.; WOODARD, G.; CALVERY, H. O. Method for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.82, p.337-390, 1944.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of brasilian medicinal plants. **Journal Ethnopharmacology**, v.97, p.305-311, 2005.

EL-ASHMAWY, I. M.; EL-NAHAS, A. F.; SALAMA, O. M. Protective Effect of Volatile Oil, Alcoholic and Aqueous Extracts of *Origanum majorana* on Lead Acetate Toxicity in Mice. **Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.97, p. 238–243, 2005.

FAHIM, F.; ESMAT, A. Y.; FADEL, H. M.; HASSAN, K. F. S. Allied studies on the effect of *Rosmarinus officinalis* L. on experimental hepatotoxicity and mutagenesis. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v.50, p.413–427, 1999.

FARAH, C. S.; ASHMAN, R. B.; CHALLACOMBE, S. J. Oral Candidosis. **Clinical Dermatology**, v.18, p.553-62, 2000.

FARIA, L. R. D. Validação farmacológica do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) – atividades antiinflamatória e analgésica. 2005. 66f. Dissertação (Mestre em Ciência Animal), Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, Alfenas/MG.

FERA, M. T.; CAMERA, E. L. C.; DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.7, p.981–998, 2009.

FERRARA, L.K.; MONTESANTO, D.; CHIANTESE, C. *Origanum marjoran* L. in medicine and foods. **Ingredientia Alimentaria**, v.2, p.23-25, 2003.

FREIRE, I. C. M.; GOUVEIA, C. L.; FIGUEIREDO, R. D. A.; LEITE, M. L. A. S.; CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica do Óleo Essencial de *Rosmarinus officinalis* Sobre a Cinética do Crescimento de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v.16, n.3, p.343-346, 2012.

GACHKAR, L.; YADEGARI, D.; REZAEI, M. B.; TAGHIZADEH, M.; ASTANEH, S. A.; RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, v.102, n.3, p.898-904, 2007.

GALUPPI, R.; AURELI, S.; BONOLI, C.; OSTANELLO, F.; GUBELLINI, E.; TAMPIERE, M. P. Effectiveness of essential oils against *Malassezia* spp.: comparison of two *in vitro* tests. **Mikologia Lekarska**, v.17, n.2, p.79-84, 2010.

GASPARETTO, A.; NEGRI, M. F. N.; PAULA, C. R.; SVIDZINSKI, T. I. E. Produção de biofilme por leveduras isoladas de cavidade bucal de usuários de prótese dentária. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 27, n. 1, p. 37-40, 2005.

GIANNENAS, I.; FLOROU-PANERI, P.; PAPAZHARIADOU, M.; CHRISTAKI, E.; BOTSOGLOU, N.A.; SPAIS, A.B. Effect of dietary supplementation with oregano essential oil on performance of broilers after experimental infection with *Eimeria tenella*. **Archives of Animals Nutrition**, v.57, p.1477-2817, 2003.

GOW, N. A. R.; VEERDONK, B. F. A. J. P.; NETEA, M. G. *Candida albicans* morphogenesis and host defence: discriminating invasion from colonization. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, p.112-122, 2012.

HARAGUCHI, H. Inhibition of lipid peroxidation and superoxide generation by diterpenoids from *Rosmarinus officinalis*. **Planta Medica**, v.61, p.333-336, 1995.

HELAL, R. G.; STELATO, M. M. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare*. In: XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC-Campinas, 2009, Campinas, Brasil. **Anais...**Campinas, 2009.

JESUS, F. P. K.; LAUTERT, C.; ZANETTE, M. A. H. L.; AZEVEDO, M. I.; MACHADO, M. L. S.; DUTRA, V., BOTTON, S. A.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. *In vitro* susceptibility of fluconazole-susceptible and -resistant isolates of *Malassezia pachydermatis* against azoles. **Veterinary Microbiology**, v.152, p.161-164, 2011.

KABOUCHE, Z.; BOUTAGHANE, N.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, A.; AIT-KAKI, Z.; BEMLABED, K. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. **International Journal Aromatherapy**, v.15, n.3, p.129-33, 2005.

KEN, H. W. Y. **Tratado de Farmacognosia – Drogas de Origen Vegetal – Mejorana**. Atlante: México, 1951, p.934.

KHAN, A.; BASHIR, S.; KHAN, S.R.; GILANI, A.H. Antiuro lithic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. **Complementary Alternative Medicine**, v.11, 96, 2011.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, n.3, p.241-248, 2009.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINS-VACCARI, E. M.; MELO, N.

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.

LEE, J.; LEE, J. Inhibitory effect of Plant Essential Oils on *Malassezia pachydermatis*. **Journal of Applied Biology Chemistry**, v.53, n.3, p.184-188, 2010.

LIMA, I. O.; Oliveira, R. A. G.; Lima, E. O.; Farias, N. M. P.; Souza, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LIMA, I.O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

LUCARINI, R. Extratos brutos do alecrim como potencial agente antibacteriano frente ao *clostridium perfringens*. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia, Brasil. **Anais...** Águas de Lindóia, 2008.

MACHADO. M. L. S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L. et al. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Clínica Veterinária**, n.44, p.27-34, 2003.

MAGNUSSON, B.; KLIGMAN, A. M. The identification of contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test. **Journal of Investigative Dermatology**, v.52, p.268-276, 1969.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; BAGGHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.228, p.111-117, 2001.

MARCHIORI, V. F. **Rosmarinus officinalis**. 2004. 32f. Monografia. Fundação Herbarium - Associação Argentina de Fitomedicina.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **International Journal of Food Microbiology**, v.67, 187-195, 2001.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa : Editora UFV, 2000. 220p.

MELCHERT, A.; MOTTA, Y. P.; GIUFFRIDA, R.; LAPOSY, C. B. Avaliação citológica e microbiológica do lavado broncoalveolar em cães hígdos. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.1, p.157-164, 2008.

MELO, P. S.; DURAN, N.; HAUN, M. Cytotoxicity of derivatives from dehydrocrotonin on V79 cells and *Escherichia coli*. **Toxicology**, v.159, p.135–141, 2001.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.1, p.21-35, 2001.

MOREIRA, A. C. P.; LIMA, E. O.; WANDERLEY, P. A.; CARMO, E. S.; SOUZA, E. L. Chemical composition and antifungal activity of *Hyptis suaveolens* (L.) poit leaves essential oil against *Aspergillus* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p.28-33, 2010.

MORETTI, A.; BONCIO, L.; POSTERARO, B.; MECHELLI, L.; BALDUCCI, M.; FADDA, G.; LA SORDA, M.; DI CHIO, M.; GRELLONI, V.; AGNETTI, F. Cutaneous infection in a dog: pcr-reverse identification of *C. tropicalis* on skin biopsy. **Journal of Mycologie Medicale**, v.16, n.1, p.30-6, 2006.

MUELLER, E. N. **Microclima do canal auditivo de cães e efeito do *Rosmarinus officinalis* L. e do *Triticum vulgare* no tratamento da otite externa experimental**. 2011. 76p. Tese (Doutorado em Veterinária) – Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS.

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.79-82, 2004.

NASCIMENTO, P.F.C.; NASCIMENTO A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; BARBOSA JÚNIOR, A. M.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

NIJIMA, M.; KANO, R.; NAGATA, M.; HASEGAWA, A.; KAMATA, H. An azoleresistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Veterinary Microbiology**, v.149, n.1-2, p.288-290, 2011.

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.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPAR, L.F.; PEREIRA, D.I.B.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L.F.D.; SOUZA, L.L.; SOUZA, L.S. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria/RS, v.28, n.3, p.447-452, 1998.

NOGUEIRA, R. M. B.; ANDRADE, S. F. Manual de Toxicologia Veterinária. 1ª edição, Editora Roca, 2011, 323p.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; ROCCARO, A.S.; ALONZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191-195, 2004.

OECD *Guideline for the testing of chemicals 404 - Acute Dermal Irritation/Corrosion*. Adopted: 24th April 2002.

OECD *Guideline for the testing of chemicals 405 - Acute Eye Irritation/Corrosion*. Adopted: 24th April 2002.

OECD *Guideline for the testing of chemicals 405 - Acute Eye Irritation/Corrosion*. Adopted: 2 October 2012.

OECD *Guideline for the testing of chemicals 406– Skin Sensitisation* adaptado em 17 de julho de 1992.

OLIVEIRA, J. L. T. M.; DINIZ, M. F. M.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; TRAJANO, V. N.; SANTOS, B. H. C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in Inhibiting the Growth of Bacterial Strains Isolated from the Patients with Conjunctivitis. **Brazilian Archives Biology and Technology**, v.52, n.1, p. 45-50, 2009.

PACKER, J. F.; LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PISTELLI, L.; MANCIANTI, F.; BERTOLI, A.; CIONI, P. L.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; MUGNAINI, L.; NARDONI, S. Antimycotic Activity of Some Aromatic Plants Essential Oils Against Canine Isolates of *Malassezia pachydermatis*: An *in vitro* Assay. **Open Mycology Journal**, n.6, p.17-21, 2012.

POZZATTI, P. **Suscetibilidade de *Candida* spp sensíveis e resistentes ao fluconazol frente a óleos essenciais extraídos de condimentos**. 2007. 148p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria.

PRESTES, L. S.; FRASCOLLA, R.; SANTIN, R.; SANTOS, M. A. Z.; SCHRAMM, R. C.; RODRIGUES, M. R. A.; SCHUCH, L. F. D.; MEIRELES, M. C. A. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. **Revista Cubana de Plantas Medicinai**s, v.13, p.4-8, 2008.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. L. S.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.8, n.4, p.92-5, 2006.

RIGHI, D. A.; SPINOSA, H. S.; PALERMO-NETO, J. Avaliação da toxicidade. In: SPINOSA, H.S.; GÓRNIK, S.L.; PALERMO-NETO, J. Toxicologia aplicada à Medicina Veterinária. 1ª edição, Editora Manole, Barueri – São Paulo, 2008, cap.3, p.41-67.

RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. **Trakia Journal of Sciences**, v.7, n.1, p.37-43, 2009.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v.91, n.4, p.621-32, 2005.

SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v.22, n.4, p.421-424, 2009.

SANTIN, R. **Isolamento, identificação e suscetibilidade *in vitro* de leveduras isoladas da cavidade oral de fêmeas caninas**. 2009. 89p. Dissertação (Mestrado em Veterinária) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS.

SANTOS, J. A.; MARTINS, L. A. Atividade *in vitro* de antifúngicos frente a isolados de *Malassezia* spp. de animais atendidos no hospital veterinário da Unipar. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia Unipar**, v.11, n.2, p.175-178, 2008.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F. J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.790-5, 2005.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.

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**, n.35, p.275-280, 2004.

SHAREEF, B.T.; HARUN, A.; ROZIAWATI, Y.; SHAIKUL BAHARI, I.; DERIS, Z.Z.; RAVICHANDRAN, M. Recurrent *Trichosporon asahii* Glossitis: A Case Report. **Journal of Contemporary Denental Practice**, v.9, n.3, p.114-120, 2008.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-240, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. 1102p.

SIVROPOULOUS, A.; PAPANIKOLAOU, E.; NIKOLAOU, C.; KOKKINI, S.; LANARAS, T.; ARSENAKIS, M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.44, n.5, p. 1202-1205, 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, N. A. B. **Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos**. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB.

SOUZA, N. A. B.; LIMA, E. O.; GUEDES, D. N.; PEREIRA, F. O.; SOUZA, E. L.; SOUSA, F. B. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.3, 2010.
T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus*. **International Journal Food of Microbiology**, v.64, 373-378, 2001.

VEIGA JR, V. F.; PINTO, A.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura segura?. **Química Nova (Impresso)**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.308-313, 2008.

WANG, W.; LI, N.; LUO, M.; ZU, Y.; EFFERTH, T. Antibacterial Activity and Anticancer Activity of *Rosmarinus officinalis* L. Essential Oil Compared to That of Its Main Components. **Molecules**, v.17, p.2704-2713, 2012.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas Medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna**. Chapecó-SC, Argus, 2001, 523 p.

YURAYART, C.; CHINDAMPORN, A.; SURADHAT, S.; TUMMARUK, P.; KAJIWARA, S.; PRAPASARAKUL, N. Comparative analysis of the frequency, distribution and population sizes of yeasts associated with canine seborrheic dermatitis and healthy skin. **Veterinary Microbiology**, v.148, n.2-4, p.356-62, 2011.