

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Toxicidade dérmica e ocular do óleo essencial de orégano 3%
(*Origanum vulgare* L.)**

Autora: Tatiana Larissa Schuch

PORTO ALEGRE

2011/2

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA**

**Toxicidade dérmica e ocular do óleo essencial de orégano 3%
(*Origanum vulgare* L.)**

Autora: Tatiana Larissa Schuch

**Trabalho apresentado como
requisito parcial para graduação
em Medicina Veterinária**

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Co-orientador: Rafael Stedile

PORTO ALEGRE

2011/2

DEDICATÓRIA

A minha avó Maria Lucena, pelo exemplo
de amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A todos os animais, em especial aos caninos, felinos e roedores pela imensa contribuição ao meu aprendizado acadêmico e exemplos para a vida.

Aos meus pais, Tânia e Vilmar, pelos cuidados e educação.

Ao meu irmão, Vinicius, pela amizade e parceria.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Roberto de Braga Mello, pela oportunidade de estágio e confiança no meu trabalho.

Ao Profa. Dra. Fernanda Mello, pela amizade e aprendizados.

A Clarissa Hollembach, pela amizade e paciência nas explicações ao longo dos meus 4 anos de estágio no Laboratório de Farmacologia do ICBS.

Ao Rafael Stedile pela amizade e grande ajuda na co-orientação da minha monografia.

Ao meu namorado Éverton, pelo amor, carinho e companheirismo.

Aos colegas da ATMV 2011/2 por proporcionarem momentos descontraídos e divertidos ao longo da nossa empreitada, especialmente ao Éverton, Gabriel Lima, Fernando, Gabriel Frainer, Caroline Gomes, Gabriela Reiter e Paola.

Aos meus amigos irmãos, Cláudia Poli, Lídia Link e Bruno Zaccolo, pela grande importância que vocês têm na minha vida.

A Pity, Lola, Brisa, Téo, Johnny, Negresco, Vika e Jimmy, meus amigos peludos.

A UFRGS, CNPq e PIBIC pelo auxílio financeiro durante o tempo de bolsista.

A Deus, por me dar a vida.

“Viva a tua maneira, não perca a estribeira, saiba do teu valor. E amanheça brilhando mais forte que a estrela do norte que a noite entregou” (Teatro Mágico)

RESUMO

As formas alternativas de tratamento, como os fitoterápicos, vem ganhando espaço nessa busca pela melhor forma de combater enfermidades tanto na medicina humana, quanto na veterinária. Desde o início das civilizações, já se utilizava a fitoterapia como método terapêutico. No entanto, deve-se observar que a definição de medicamento fitoterápico é diferente de fitoterapia, pois não engloba o uso popular das plantas em si, mas sim seus extratos. Os medicamentos fitoterápicos são preparações técnicas elaboradas farmacologicamente a partir de princípios ativos extraídos de plantas medicinais. Do *Origanum vulgare L.*, o orégano, é possível extrair importante óleo essencial, que possui compostos fenólicos, como timol, carvacrol, alfa-terpineol e gama-terpineol. O óleo essencial é responsável pela conhecida propriedade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante. Sendo assim, apresenta grande potencial para desenvolver a partir dele um fitoterápico. A legislação brasileira sobre medicamentos que é de responsabilidade da ANVISA, que normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil, estabelece que deverá haver a comprovação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica e clínica) e eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica) do medicamento, para fins de uso terapêuticos e profiláticos. A avaliação dos potenciais riscos da sua utilização, especialmente no que se refere à toxicidade ocular e dérmica, foi realizada através de testes em animais expostos ao óleo, seguindo os protocolos de ensaios toxicológicos internacionais da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). O óleo essencial do *O. vulgare* quando administrado à 3% pelas vias ocular e dérmica em ratos e coelhos, não causou efeitos tóxicos, irritativos permanentes ou corrosivos.

Palavras-chaves: Orégano – Irritação cutânea – Irritação ocular

ABSTRACT

Alternative forms of treatment such as herbal medicines, has been gaining ground in this quest for the best way to combat diseases both in human medicine and in veterinary medicine. Since the beginning of civilization, was used as herbal medicine as a therapeutic method. However, it should be noted that the definition of herbal medicine herbal medicine is different, because it includes the popular use of the plant itself, but its extracts. Herbal medicines are prepared from techniques developed pharmacologically active principles extracted from medicinal plants. Of *Origanum vulgare* L., oregano, you can extract important essential oil, which has phenolic compounds such as thymol, carvacrol, alpha-and gamma-terpineol. The essential oil is responsible for the property known antimicrobial, antifungal and antioxidant. Thus, has great potential to develop from it a herbal. The Brazilian legislation on drugs that is the part of ANVISA, which regulates the registration of herbal medicines in Brazil, states that there should be proof of safety of use (preclinical toxicology and clinical) and treatment efficacy (pre-clinical pharmacology, pharmacology clinical) of the drug, for therapeutic or prophylactic use. The assessment of potential risks of its use, especially with regard to the ocular and dermal toxicity, was performed by testing in animals exposed to oil, following the protocols for the toxicological international Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). The essential oil of *O. vulgare* when administered to 3% by the way the eye, skin and skin in rats and rabbits did not cause toxic effects, permanent irritant or corrosive.

Keywords: Oregano - Skin irritation - Eye irritation

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 -	Escores das lesões oculares.....	22
Tabela 02 -	Grau de reação da pele.....	25
Tabela 03 -	Valores da classificação de primeira aproximação.....	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 -	<i>Origanum vulgare</i> L.....	14
Figura 02 -	Óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> L.....	17
Figura 03 -	Rato Wistar durante as 24 horas de exposição a substância teste.....	19
Figura 04 -	Rato Wistar após a remoção da substância teste.....	19
Figura 05 -	Avaliação ocular com fluroseína no segundo dia depois da aplicação: negativo para úlceras.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µL	Microlitro (s)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CO ₂	Dióxido de carbono
CREAL	Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório
GC/FID	Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama
g	gramas
ICBS	Instituto de Ciências Básicas de Saúde
cm	Centímetro (s)
L	Litro (s)
m	Metro (s)
mL	Mililitro (s)
mm	Milímetro (s)
mM	Milimolar
MM	Media máxima
M1	Minimamente irritante
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
RS	Rio Grande do Sul
UFPel	Universidade Federal de Pelotas
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UI	Unidade Internacional

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	11
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	13
2.1	Considerações históricas.....	13
2.2	Óleos essenciais.....	13
2.3	Aspectos botânicos do <i>Origanum vulgare</i> (L.) Orégano.....	14
2.3.1	Aspectos gerais.....	14
2.3.2	Sinonímia.....	14
2.3.3	Constituintes químicos do óleo essencial do orégano.....	15
2.4	Usos médicos.....	15
2.5	Propriedades do óleo essencial do orégano.....	16
2.6	Toxicologia do orégano.....	17
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	18
3.1	Obtenção do óleo essencial.....	18
3.2	Análise do óleo essencial.....	18
3.3	“Ensaio de toxicidade cutânea aguda”.....	19
3.3.1	Animais.....	19
3.3.2	Grupos experimentais.....	19
3.3.3	Protocolo experimental.....	19
3.3.3.1	<i>Tratamento</i>	19
3.3.3.2	<i>Eutanásia</i>	19
3.3.4	Variáveis avaliadas.....	20
3.4	“Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda”.....	21
3.4.1	Animais.....	21
3.4.2	Grupos experimentais.....	21
3.4.3	Protocolo experimental.....	22
3.4.3.1	<i>Tratamento</i>	22
3.4.3.2	<i>Período de observação</i>	22
3.4.3.3	<i>Eutanásia</i>	23
3.4.4	Variáveis avaliadas.....	23
3.5	“Ensaio de irritação/corrosão cutânea aguda”.....	24
3.5.1	Animais.....	24
3.5.2	Grupos experimentais.....	24

3.5.3	Protocolo experimental.....	25
3.5.3.1	<i>Tratamento</i>	25
3.5.3.2	<i>Eutanásia</i>	25
3.5.4	Variáveis avaliadas.....	25
3.6	Descarte	26
4	RESULTADOS	27
5	DISCUSSÃO	28
6	CONCLUSÕES	29
	REFERÊNCIAS	30

1 INTRODUÇÃO

Na medicina os estudos para obtenção de métodos profiláticos e terapêuticos mais eficazes é constante. As formas alternativas de tratamento, como os fitoterápicos, vem ganhando espaço nessa busca pela melhor forma de combater enfermidades tanto na medicina humana, quanto na veterinária. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos a aspectos botânicos, fitoquímicos, farmacológicos e toxicológicos.

Nesta linha de pesquisa, tem sido crescente a investigação do potencial antimicrobiano de produtos de origem vegetal. A preocupante realidade do progressivo surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos, impulsiona também esta busca. O uso indiscriminado de compostos antimicrobianos apresenta-se como o fator principal de pressão para o surgimento de tal fenômeno de resistência (ANDREMONT, 2001).

Do *Origanum vulgare L.*, o orégano, é possível extrair importante óleo essencial, que possui compostos fenólicos, como timol, carvacrol, alfa-terpineol e gama-terpineol. O óleo essencial é responsável pela conhecida propriedade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (KABOUCHE et. al., 2005). Sendo assim, apresenta grande potencial para desenvolver a partir dele um fitoterápico.

Os óleos essenciais são produtos de extração de uma espécie vegetal, portanto, são mais concentrados, e podem apresentar toxicidade mais elevada do que a planta original (SIMÕES et. al., 2003). Sendo assim, há a necessidade da realização de estudos toxicológicos para garantir a segurança do uso destes produtos. Além disso, em cooperação com grupos de pesquisa da UFPel (Microbiologia Veterinária e Química), estão sendo desenvolvidos estudos químicos e de potenciais terapêuticos do óleo essencial de orégano, sendo os estudos toxicológicos indispensáveis e complementares, tendo em vista as possibilidades terapêuticas promissoras.

A legislação brasileira sobre medicamentos que é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, em sua resolução RDC nº 48 e resoluções RE nº 88, 89, 90, 91 de 16 de março de 2004, que normatiza o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil, estabelece que deverá haver a comprovação de segurança de uso (toxicologia pré-clínica e clínica) e eficácia terapêutica (farmacologia pré-clínica, farmacologia clínica) do medicamento, para fins de uso terapêuticos e profiláticos.

O presente trabalho objetivou realizar uma revisão bibliográfica acerca das

propriedades químicas e potenciais terapêuticos do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.). E principalmente, avaliar os potenciais riscos da sua utilização, especialmente no que se refere à toxicidade ocular e dérmica através de testes realizados em animais expostos ao óleo, seguindo os protocolos de ensaios toxicológicos internacionais da Organization for Economic Cooperation and Development (OECD).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Considerações históricas

Origanum vulgare L. é nativa da Europa mediterrânea, e as primeiras referências de uso culinário e medicinal é nas revisões helénica, mas possivelmente o seu uso remonta aos povos pré-históricos.

O termo *Origanum* vem de duas palavras gregas: ouro (montanha) e ganos (enfeite), assim que estes se definem como beleza ou adorno das montanhas (HERBÁRIO, 2011) . Uma lenda como Afrodite, deusa do amor, foi o primeiro a plantar orégano fornecendo-lhe uma fragrância intensa. Os romanos também empregaram em seus pratos, em alguns casos, misturado com o sabor forte do *Origanum* da colônia romana de Cartago Nova. Ambos os povos também sabiam as propriedades curativas de orégano e eram usado para tratar distúrbios do sistema nervoso, retenção de líquidos, dor e hematomas comuns. O orégano também é usado em infusão para tratar problemas como tosse, bronquite e cólicas intestinais, além de ter ações antimicrobióticas.

Durante a Idade Média, era usado para tratar problemas de fígado e no meio ambiente como um desinfetante durante epidemias.

Colombo, após a descoberta da América no século XV trouxe as sementes desta espécie para testar o cultivo da terra na América do Sul, onde se adaptou rapidamente ao novo clima, subindo para os ingredientes utilizados em receitas tradicionais dos povos novos mestiço.

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos líquidos complexos, orgânicos, solúveis em solvente orgânicos apolares, lipofílicos, voláteis, delicados, aromáticos, de saber ácido ou picante, incolores, quando recentemente extraídos ou ligeiramente amarelados, e de aparência oleosa. Também chamados de óleos voláteis ou essenciais e são extraídos de diversas partes das plantas como: folhas, flores, sementes, brotos, galhos, cascas de caule, frutos e raízes. Em contato com a água, os óleos essenciais apresentam solubilidade limitada, mas suficiente para aromatizar as soluções aquosas denominadas hidrolatos. E por serem voláteis, necessitam ser estocados em recipientes hermeticamente fechados e protegidos da luz direta, calor, umidade e metais (SIMÕES; SPITZER, 2003).

As plantas aromáticas e as especiarias são ricas em óleos essenciais caracterizados por uma notável atividade antimicrobiana, e por esta razão, seus produtos derivados podem ser usados para retardar ou inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes (MARINO et. al., 2001).

Do *Origanum vulgare L.*, o orégano, é possível extrair importante óleo essencial, que possui compostos fenólicos, como timol, carvacrol, alfa-terpineol e gama-terpineol. O óleo essencial é responsável pela conhecida propriedade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante (KABOUCHE et al., 2005). Sendo assim, apresenta grande potencial para desenvolver a partir dele um fitoterápico.

2.3 Aspectos botânicos do *Origanum vulgare* (L.) Orégano

2.3.1 Aspectos gerais

Origanum vulgare L. conhecido como orégano é um vegetal da família Lamiaceae (**Figura 1**). Herbácea, bastante ramificado, perene na forma de arbusto, aromático, de hastes certas vezes arroxeadas, possuindo proporção de 30 a 50 cm de altura, é originário de regiões montanhosas e pedregosas do sul da Europa, cultivado largamente na região sul e sudeste do Brasil, para uso culinário. A dimensão de suas folhas possui de um a dois cm de comprimento ao passo que suas flores, no que se refere ao aspecto cromático, são esbranquiçadas, rosas ou violáceas, arranjadas em inflorescências paniculadas terminais (JOLY, 1998; LORENZI; MATOS, 2008).

2.3.2 Sinonímia

A Sinonímia apresentada da literatura para orégano comum é: *Micromeria formosana* C. Marquand, *Origanum creticum* Lour., *Origanum dilatatum* Klokov, *Origanum normale* D. Don e *Origanum puberulum* Klokov (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 01 - *Origanum vulgare* L.,
vegetal da família
Lamiaceae.



Fonte: <http://www.garten.cz/a/cz/3018-origanum-vulgare-dobromysl-obecna/>

2.3.3 Constituintes químicos do óleo essencial do orégano

Fatores geográficos, variedade, espécie, estágio de crescimento da planta, a época que é realizada a colheita, além do método de extração, pode influenciar na composição química, qualidade e quantidade de óleo essencial presente nos vegetais (SIMÕES et.al., 2003).

Segundo Oliveira et. al. (2008), análises cromatográficas permitiram identificar, em média, cerca de 34 compostos, sendo os constituintes majoritários, além do timol e carvacrol (monoterpenos fenólicos), responsáveis pelas atividades antifúngicas, foram α -terpineno, p-cimeno, γ -terpineno e limoneno (hidrocarbonetos monoterpênicos), 4-terpineol, α -terpineol e linalol (alcoóis monoterpênicos).

Na literatura, consta que o óleo essencial de *Origanum vulgare* apresenta composição variável de compostos ativos, sendo que os fenóis como carvacrol, timol, podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo (REHDER et. al., 2004; RODRIGUES, 2004).

2.4 Usos médicos

Na medicina é bastante usado devido as suas propriedades terapêuticas como antibacterianas, antifúngicas, anti-inflamatórias, antioxidantes e digestivas (LORENZI e MATOS, 2008). As folhas secas e o óleo essencial de *Origanum vulgare* têm sido usados medicinalmente por vários séculos em diferentes partes do mundo, e seu efeito positivo sobre a saúde humana tem sido atribuído à presença de compostos antioxidantes na erva e conseqüentemente em seus produtos derivados (PEAK et. al., 1991; CERVATO et. al., 2000).

2.5 Propriedades do óleo essencial do orégano

A noção de que, as espécies *Origanum* tem ação antibacteriana, antifúngica, antioxidante, inseticida e anticancerígeno, motivou o estudo das atividades biológicas de seu conteúdo de óleo essencial (Ipek et. al., 2005). De fato, purificados óleos essenciais e respectivas frações; carvacrol, timol, limoneno e cineol; têm demonstrado amplamente as propriedades antimicrobianas *in vitro* (ULTEE et. al., 2002 e FALEIRO et. al., 2003).

O óleo essencial do orégano e seus constituintes químicos têm mostrado eficiência no combate do crescimento e sobrevivência de bactérias e fungos contaminantes de alimentos, bem como inibindo a produção de toxinas microbianas (DE SOUZA et. al., 2005). O orégano tem-se revelado uma alternativa para prevenção e tratamento de enfermidades, indicado como bactericida e inseticida, apresentando atividade antimicrobiana comparável, ou inclusive maior, que os compostos tipicamente utilizados para estes propósitos (LOZANO et. al., 2004). Existem diversos estudos sobre a atividade antimicrobiana dos extratos de diferentes tipos de orégano, tendo como modo de ação a interação com a membrana celular alterando a permeabilidade de cátions como H^+ e K^+ (ULTEE et. al., 1999).

Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Origanum vulgare*, foi avaliada em estudos onde se comprovou seu efeito antimicrobiano frente a bactérias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* e sobre bactérias Gram negativas (ALBADO et. al., 2001). Em lactobacilos e *E. coli*, também demonstrou efeito bactericida (HOROSOVÁ et. al., 2006).

Sua atividade antifúngica também tem sido estudada, Meinerz et. al. (2006) pesquisaram a sensibilidade de fungos dimórficos e levedura (*Malassezia pachydermatis* e *Sporothrix schenckii*) ao óleo essencial de *O. vulgare*, onde todos isolados apresentaram sensibilidade. Cleff et. al. (2005), avaliaram óleo essencial de orégano frente a fungos filamentosos, como *Aspergillus fumigatus*, *A. fumigatus*, *A. flavus*. Giordani et. al. (2004), também comprovaram a ação antifúngica do óleo essencial de *O. vulgare* em *Candida albicans* em testes *in vitro*.

O orégano tem sido muito estudado em função de possuir propriedade antioxidante. O extrato metanólico do *Origanum vulgare* mostrou-se efetivo na estabilização de banha de porco (ECONOMOU et. al., 1991).

2.6 Toxicologia do orégano

Os óleos essenciais são produtos de extração de uma espécie vegetal, portanto, são mais concentrados, e podem apresentar toxicidade mais elevada do que a planta original (SIMÕES et. al., 2003). Todavia, são escassos os trabalhos sobre a toxicidade do referido óleo. Um trabalho descreve que o grau da toxicidade de um extrato depende de vários fatores, entre eles da dose utilizada e da frequência de administração, (VICENZI et. al., 2004).

Testes avaliaram a toxicidade pré-clínica da administração em doses repetidas do óleo essencial do *Origanum vulgare* em ratas Wistar., durante o período de observação de 30 dias nenhum dos animais experimentais apresentou alterações clínicas, comportamentais, de deambulação ou morte, ao receberem o óleo essencial do *O. vulgare* a 3% (CLEFF et. al., 2008). De acordo com os resultados, *O. vulgare* não causa alterações toxicológicas relevantes nas condições testadas, no entanto, há necessidade de estudos adicionais incluindo um período maior de administração e, utilizando óleos com diferentes doses, além de outros testes de avaliação toxicológica.

Ipek et. al. (2005) avaliaram os efeitos genotóxicos e antigenotóxicos do óleo essencial de *Origanum onites* L. e de carvacrol, através do teste Ames Salmonela. A atividade mutagênica foi inicialmente rastreada usando linhagens *Salmonella typhimurium* TA98 e TA100, com ou sem ativação metabólica. Não foi encontrada mutagenicidade no óleo essencial de ambas as linhagens, pelo contrário, ambas as amostras inibiram fortemente a mutagenicidade.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi desenvolvido no Instituto de Ciências Básicas de Saúde (ICBS) no Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), localizado em Porto Alegre/RS.

3.1 Obtenção do óleo essencial

O orégano (*Origanum vulgare* L.) utilizado no experimento foi adquirido em distribuidor comercial, que forneceu um produto com certificado de qualidade, de origem e identificação botânica. O óleo essencial (**Figura 02**) da planta foi extraído por hidrodestilação em aparelho Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira IV. Após a extração, o óleo foi seco em Na₂SO₄ anidro, grau p.a., concentrado sob N₂ ultra puro e foi armazenado em frascos âmbar, mantido sob refrigeração.

Figura 02 – Óleo essencial de *Origanum vulgare* L.



Fonte: arquivo próprio.

3.2 Análise do óleo essencial

O óleo essencial obtido foi analisado por Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama (GC/FID), sendo caracterizado em função dos principais constituintes químicos. Para tanto, um µl de soluções de concentrações variadas de padrões foram injetadas no cromatógrafo e comparados com o tempo de retenção de padrões referentes aos principais compostos presentes em amostras de orégano.

3.3 “Ensaio de toxicidade cutânea aguda”

A realização desse ensaio foi de acordo com as normas da OECD.

3.3.1 Animais

Foram utilizados ratos albinos Wistar de ambos os sexos, com idade inicial de 120 dias e 200 a 300g/massa corporal, provenientes do Centro de Criação e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) da UFRGS. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do ICBS com condição constante de umidade (50 – 60%), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas. Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Alojamento, manejo, tratamento e eutanásia dos animais obedeceram as normas publicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; 1996), obedecendo as leis brasileiras: Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008; Lei n.º 6.638, de 08 de maio de 1979; Decreto n.º 24.645 de 10 de julho de 1934.

3.3.2 Grupos experimentais

Foram utilizados cinco machos e cinco fêmeas para o teste limite na dose de 2000mg/kg de peso corporal. As fêmeas utilizadas eram nulíparas. O número de animais utilizados neste projeto segue os protocolos internacionais para testes em toxicidade, regulamentados pela OECD.

3.3.3 Protocolo experimental

3.3.3.1 *Tratamento*

A substância teste foi aplicada uniformemente sobre uma área de aproximadamente 10% da superfície total do corpo. Sendo mantida em contacto com a pele com uma gaze porosa e fita não irritante ao longo de um período de exposição de 24 horas (**Figura 03 e 04**). A utilização de colares limitadores (tipo Elizabetano) fez-se necessária para garantir que os animais não pudessem ingerir a substância. Após o final do período de exposição, os resíduos

da substância foram removidos com água.

O período de observação foi de 14 dias, determinado pelas reações tóxicas, taxa de aparecimento dos sinais de toxicidade e duração do período de recuperação.

Figura 03 – Rato Wistar durante as 24 horas de exposição a substância teste.



Fonte: arquivo próprio.

Figura 04 – Rato Wistar após a remoção da substância teste.



Fonte: arquivo próprio.

3.3.3.2 Eutanásia

Os ratos foram eutanasiados em câmara de CO₂, 14 dias após a exposição com o agente. A pele e a parede abdominal foram incisadas e os órgãos avaliados macroscopicamente.

3.3.4 Variáveis avaliadas

As observações foram registadas sistematicamente à medida que foram feitas. Foram mantidos registros individuais para cada animal. Após a aplicação da substância de ensaio, os animais foram observados com frequência durante o primeiro dia e em seguida, um exame clínico foi realizado uma vez ao dia. Os parâmetros avaliados foram: alterações na pele, olhos

e mucosas, aparelho respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso central e atividade locomotor e do comportamento. Também foi dada uma atenção especial à observação de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono e coma. A massa corporal (g) foi determinada imediatamente após a aplicação da substância, diariamente e no descarte. Um controle diário de consumo de ração (g), água (mL), aparecimento de sinais de toxicidade sistêmica como perda de peso progressiva e redução na ingestão de água e ração e percentual de mortalidade durante o experimento.

3.4 “Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda”

A realização desse ensaio foi de acordo com as normas da OECD.

3.4.1 Animais

Foram utilizados coelhos albinos adultos jovens, de ambos os sexos, com massa corporal média de 3000 g, provenientes do CREAL da UFRGS. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do ICBS com condição constante de umidade, temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas.

Foram alimentados com ração comercial Nuvilab Coelhos (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Alojamento, manejo, tratamento e eutanásia dos animais obedeceram as normas publicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA; 1996), obedecendo as leis brasileiras: Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008; Lei n.º 6.638, de 08 de maio de 1979; Decreto n.º 24.645 de 10 de julho de 1934.

3.4.2 Grupos experimentais

O número de animais utilizados neste projeto segue os protocolos internacionais para testes em toxicidade, regulamentados pela OECD.

Foram utilizados quatro machos e duas fêmeas para o teste limite na dose de 2000 mg/kg de peso corporal. As fêmeas utilizadas eram nulíparas.

3.4.3 Protocolo experimental

3.4.3.1 *Tratamento*

A substância de ensaio foi colocada na uma dose de 0,1 mL, no saco conjuntival de um dos olhos de cada animal, depois delicadamente a pálpebra inferior do globo ocular foi puxada de forma a tampar cuidadosamente o olho, durante cerca de um segundo para evitar a perda do material. O outro olho, que permaneceu sem tratamento, serviu como controle.

Foi usado um veículo junto ao óleo para assegurar uma boa distribuição da substância pelo globo ocular. Este protocolo experimental também foi utilizado para testar uma eventual influência do veículo sobre a irritação ocular.

3.4.3.2 *Período de observação*

Um período de observação de até 21 dias é necessário para avaliar completamente a magnitude e reversibilidade dos efeitos da substância teste. Os olhos foram examinados com uma, 24 (**Figura 05**), 48 e 72 horas após a aplicação, sendo que os coelhos que não desenvolveram lesões oculares foram eutanasiados logo após esse período de avaliação. As observações foram realizadas em sete, 14 e 21 dias para determinar o estado das lesões e a sua reversibilidade ou irreversibilidade. Os animais que apresentaram lesões leves a moderadas reversíveis, tiveram seu período de observação estendido até a reversibilidade do quadro. No caso de lesões graves irreversíveis, o período de observação durou 21 dias.

Figura 05 – Avaliação ocular com fluroseína no segundo dia depois da aplicação: negativo para úlceras.



Fonte: M.V. Rafael Stedile

3.4.3.3 Eutanásia

Os coelhos foram eutanasiados em câmara de CO₂, 21 dias após a exposição com o agente.

3.4.4 Variáveis avaliadas

Os graus da reação ocular (conjuntiva, córnea e íris) foram registrados a cada exame físico seguindo os escores das lesões oculares (**Tabela 01**). Quaisquer outras lesões do olho (por exemplo, coloração) ou efeitos adversos sistêmicos também foram notificados.

Para facilitar o exame das reações foi utilizado um oftalmoscópio e após as 24 horas, os olhos foram analisados com o auxílio de fluoresceína. Como a classificação das respostas oculares é necessariamente subjetiva, afim de promover uma harmonia na classificação da resposta, os observadores foram treinados de acordo com a pontuação do sistema utilizado.

Tabela 01: Escores das lesões oculares.

CÓRNEA	Grau
Sem ulcerações ou opacidade.	0
Áreas de opacidade dispersas ou difusas, detalhes da íris claramente visíveis.	1
Áreas translúcida facilmente discernível, detalhes da íris levemente obscurecidos.	2
Áreas nacaradas, detalhes da íris completamente invisíveis, tamanho da pupila apenas discernível.	3
Córnea opaca, íris não discernível através da opacidade	4
IRÍS	Grau
Normal.	0
Dobras mais profundas, congestão, edema, hiperemia pericorneana moderada ou vasos injetados.	1
A íris com responder positiva à luz. Ausência de reação à luz, hemorragia, destruição marcante do tecido.	2
CONJUNTIVA (referente a conjuntiva palpebral e bulbar, excluindo córnea e íris)	Grau
Normal.	0
Hiperemia de alguns vasos sanguíneos (olhos injetados).	1
Coloração púrpura difusa. Vasos sanguíneos individuais dificilmente discerníveis.	2
Coloração vermelha difusa.	3
QUEMOSE (pálpebras e/ou membrana nictante)	Grau
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

Sinais como: perfuração da córnea ou ulceração corneana significativa, incluindo estafiloma; sangue na câmara anterior do olho; opacidade da córnea de grau quatro que persiste por 48 horas, ausência de resposta à luz (reflexo da íris grau dois) que persiste por 72 horas; ulceração da membrana conjuntiva, necrose da conjuntiva ou membrana nictitante, ou descamação. Foram consideradas lesões irreversíveis.

3.5 “Ensaio de irritação/corrosão cutânea aguda”

A realização desse ensaio foi de acordo com as normas da OECD.

3.5.1 Animais

Foram utilizados coelhos albinos adultos jovens, de ambos os sexos, com massa corporal média de 3000g, provenientes do CREAL. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde (ICBS) com condição constante de umidade, temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo de luz claro/escuro de 12 horas.

Foram alimentados com ração comercial Nuvilab CR 1 (Nuvital, Colombo/PR) e água *ad libitum* durante todo o período experimental.

Alojamento, manejo, tratamento e eutanásia dos animais obedeceram as normas publicadas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA, 1996), obedecendo as leis brasileiras: Lei Nº 11.794, DE 8 de outubro de 2008; Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979; Decreto n.º 24.645 de 10 de Julho de 1934.

3.5.2 Grupos experimentais

O número de animais utilizados neste projeto segue os protocolos internacionais para testes em toxicidade, regulamentados pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD).

Foram utilizados quatro machos e duas fêmeas para o teste limite na dose de 2000mg/kg de peso corporal. As fêmeas utilizadas eram nulíparas.

3.5.3 Protocolo experimental

3.5.3.1 *Tratamento*

No dia anterior a aplicação foi realizada a tricotomia da região a receber o óleo. A substância teste foi colocada em um pequeno pedaço de gaze (aproximadamente seis cm²) e depois aplicada a pele, sendo fixada no local com fita não-irritante. A substância teste aplicada na gaze, foi anexada a pele de maneira uniforme, garantindo o máximo contato e distribuição. Utilizou-se caixas de contenção para garantir que os animais não pudessem ingerir a substância.

Fez-se uso de um veículo junto ao óleo para assegurar um bom contato com a pele. Este protocolo experimental também foi utilizado para testar uma eventual influência do veículo sobre a irritação da pele.

No final do período de exposição, que normalmente é de 4 horas, substância residual foi removida com água, sem alterar a resposta existente a integridade da epiderme. A dose de 0,5 mL foi aplicada no local de teste. O período de observação foi de 14 dias, determinado pelas reações tóxicas, taxa de aparecimento e duração do período de recuperação.

3.5.3.3 *Eutanásia*

Os coelhos foram eutanasiados em câmara de CO₂, 14 dias após a exposição com o agente.

A pele e a parede abdominal foram incisadas e os órgãos avaliados macroscopicamente.

3.5.4 Variáveis avaliadas

As avaliações foram realizadas individualmente e classificadas de acordo com o sistema empregado pelo *Federal Hazardous Substances Act the USA* (**Tabela 02**). O período de observação foi de 14 dias e os resultados foram anotados em uma, 24, 48, 72 h, 7 e 14 dias após a remoção da compressa com óleo de óregano, verificando o caráter reversível ou irreversível da resposta. Também foi acompanhada a massa corporal (g) imediatamente após a aplicação da substância e no último dia de observação e em seguida sacrificados.

Tabela 02: Grau de reação da pele.

FORMAÇÃO DE ERITEMA E ESCARAS		Grau
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		Grau
Sem edema		0
Edema muito leve (pouco perceptível)		1
Edema leve (bordas bem definidas)		2
Eritema moderado (aumento superior de aproximadamente 1mm)		3
Eritema severo (aumento superior a 1mm e estendendo além da área de exposição)		4

3.6 Descarte

Depois de realizada a eutanásia dos animais, a carcaça e demais resíduos biológicos oriundos deste processo, foram acondicionados em saco plástico branco e descartados conforme o Plano de Gestão de Resíduos em Serviço de Saúde da UFRGS, de acordo com a RDC 306 de 2004.

4 RESULTADOS

O estudo de toxicidade cutânea aguda em ratos para determinar o potencial de toxicidade de uma única aplicação tópica de óleo essencial de orégano, demonstrou que todos os animais sobreviveram, ganharam peso e permaneceram ativos e saudáveis. Não houveram sinais graves de toxicidade, irritação dérmica, ou qualquer outro efeito adverso farmacológico ou comportamento anormal. Nenhuma anormalidade foi observada para qualquer um dos animais sobre necropsia.

No estudo irritação/correção da pele em coelhos determinou o potencial do óleo em causar irritação dérmica em uma única aplicação tópica na pele de coelhos. Todos os animais estavam livres de irritação dérmica até 48 h após contato com a substância. Nas condições deste estudo, o índice de irritação dérmica para o óleo essencial de orégano é “0” e pode ser classificada como não irritante para a pele. Todos os coelhos permaneceram ativos e saudáveis, sem qualquer outro sinal de toxicidade grave ou efeitos adversos farmacológicos ou comportamento anormal.

No teste de irritação ocular em coelhos para determinar o potencial de irritação a partir de uma única instalação por via ocular, não apresentou opacidade de córnea ou irite em nenhum dos olhos tratados. Uma hora após a instilação da substância teste, todos os olhos tratados exibiram conjuntivite, e o mesmo foi revertido em 24 h. Após esse período todos os animais permaneceram livres de irritação ocular até a 72 h após administração. Além da irritação ocular observada, todos os animais apresentaram-se ativos e saudáveis, não apresentando outros sinais de toxicidade grave ou efeitos adversos farmacológicos ou comportamento anormal. A média máxima (MM) do óleo essencial de orégano é 2.6 (**Tabela 03**), classificando - o como minimamente irritante (M1) para os olhos. Para a confirmação da classificação levou-se em consideração a duração e a intensidade das reações observadas.

Tabela 03: Valores da classificação de primeira aproximação.

Média Máxima (MM)	Classificação de primeira aproximação
0,0	(N) Não irritante
< 2,5	(PN) Praticamente não irritante
2,5 – 15,0	(M ₁) Minimamente irritante
15,1 – 25,0	(M ₂) Ligeiramente irritante
25,1 – 50,0	(M ₃) Moderadamente irritante
50,1 – 80,0	(S) Severamente irritante
80,1 – 100,0	(E) Extremamente irritante
100,1 – 110,0	(Mx) Irritante máximo

5 DISCUSSÃO

Segundo estudos, os testes de toxicidade aguda envolvendo a avaliação de irritação primária da pele, toxicidade cutânea e de irritação ocular, constituem etapas importantes que indicam prováveis efeitos adversos e níveis de segurança quanto ao uso. Os resultados demonstraram que a administração do *O. vulgare* por vias cutânea e ocular, na concentração e modelo animal utilizados, não causou danos irreversíveis ou sinais de toxicidade sistêmica. Alguns autores têm descrito que o grau da toxicidade de um extrato depende de vários fatores, entre eles da dose utilizada e da frequência de administração, em alguns casos baixas dosagens acarretam intoxicações devido à sensibilidade individual, provocando desde sensibilização, alergias, até problemas mais graves, principalmente quando utilizados por via oral.

Os efeitos adversos do uso de extratos vegetais, possível toxicidade, bem como a ação sinérgica ou antagônica com outros fármacos podem ocorrer comumente, devido a estes e outros fatores, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos a vários aspectos, dentre eles quanto ao seu efeito tóxico sobre organismos animais. *Origanum vulgare* demonstra ter aplicações benéficas quanto sua ação antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, revelando ser uma alternativa para prevenção e tratamentos de algumas enfermidades mediante estudos mais específicos.

6 CONCLUSÕES

O óleo essencial do *O. vulgare* quando administrado à 3% pelas vias ocular, cutânea e dérmica em ratos Wistar e Coelhos Albinos em dose simples, não causou efeitos tóxicos, levando em conta a ausência de alterações macroscópicas permanentes no tecido cutâneo, conjuntivo ocular e na massa de órgãos, da massa corporal e da ausência de alterações de macroscópicas nos órgãos. São necessários outros estudos utilizando outros óleos com diferentes proporções de terpenos, seus principais componentes químicos, além de um período maior administração aos animais experimentais, assim como outros testes de avaliação da toxicidade.

REFERÊNCIAS

- ALBADO, P.E.; SAEZ, F.G.; GABRIEL, A.S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). **Revista Médica. Hered** v.12, n.1, p. 16-19, 2001.
- ANDREMONT, A. The future control of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Infect Control*. 29: 256-25, 2001.
- CERVATO, C.; CARABELLI, M.; GERVASIO, S.; CITTERA, A.; CAZZOLA, R.; CESTARO, B. Antioxidant properties of oregano [*Origanum vulgare*] leaf extracts. **Journal of Food Biochemistry**. 24: 453-465, 2002.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; XAVIER, M.; SOUZA, L.; NASCENTE, P.; SCHUCH, L.F.; MEIRELES, M.; RODRIGUES, R.; MELLO, J.R. **Susceptibilidade de isolados de *Aspergillus spp* frente ao óleo essencial do *Origanum vulgare*** In: Anais do V Congresso Latinoamericano de Micologia – Brasília, Agosto, p.245, 2005.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; SALLIS, E.S.; ANTUNES, T.A.; MATTEI, A.; RODRIGUES, R.; MEIRELES, M.; MELLO, J.R. **Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar** In: *Latin American Journal of Pharmacy* – July, 2008.
- DE SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, T. 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.
- DE VICENZI, M.; STAMMATI, A.; DE VICENZI, A.; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: carvacrol. *Fitoterapia*, v. 75, p. 801–804, 2004 .
- ECONOMOU, K.D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C.D.; *JAACS* 1991, 68, 109.
- FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G.; LADEIRO, F.; VENANCIO, F.; TAVERES, R.; BRITO, J. C.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; AND PEDRO, L. G., 2003. Antimicrobial activity of essential oils isolated from Portuguese endemic species of *Thymus*. **Letter of Applied Microbiology**, 36:35-40.
- FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T. Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum applii* e *Origanum vulgare*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 2004, v. 6, n. 2, p. 67-71.
- HERBÁRIO AQUILÉA. Disponível em: <http://www.cotianet.com.br/eco/herb/>. Acessado em: 13 de outubro de 2011.
- HOROSOVÁ, K.; BUJNAKOVÁ, D.; KMET, V. Effecto of oregano essential oil on chicken lactobacilli and *E. coli*. **Folia Microbiology**. v.51, n.4, p. 278-280, 2006.

- IPEK, I. et. al Genotoxicity and antigenotoxicity of Origanum oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. **Food Chemistry** v.93, pp 551–556, 2005.
- JOLY A. B. **Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal**. 12. Ed. São Paulo. Nacional, 1998. 777p.
- KABOUCHE, K.; BOUAGHANE, N.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, A.; AIT-KAKI, Z.; BENLABED, K. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria **International Journal of Aromatherapy**. Volume 15, Issue 3, p. 129-133, 2005.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2. Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.
- LOZANO, C. C. A.; PIÑA, G.L.; URIBE, S.L.; MEJÍA, E.G. **El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes**. Archivos Latinoamericanos de Nutrición (ALAN) v.54 n.1, Caracas, mar- 2004.
- MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, GIUSEPPE. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *International Journal of Food Microbiology*. 67: 187-195, 2001.
- MEINERZ, A. R. M.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B.; RODRIGUES, M. R. A. **Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* and *Sporothrix schenckii* against *Origanum vulgare* essential oil**. In: 29th International Symposium on Capillary Chromatography, Riva del Garda Fierecongressi, Riva del Garda, Italy, 29 May – 2 June, 2006.
- PEAK, P.W.; PUSSEL, B.A.; MARTYN, P.; TIMMERMANS, V.; CHARLESWORTH, J.A. The inhibitory effect of rosmarinic acid on complements involves the 5 convertase. **International Journal of Immunopharmacology**. 13: 853-857, 1991.
- REHDER, V.L.G.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; SARTORATTO, A.; RODRIGUES, M.R.A. **Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre:UFSC. 1999.
- SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G.; MELLO J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Ed. UFRGS: Porto Alegre, 2003, p. 1102.
- SIMÕES, C. M. O.;SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN G. et. al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. %. Ed. Florianópolis: UFSC, 2003. 18, p.467 – 495.
- OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, Mamalian Erythrocyte Micronucleus Test, 474, 21 July, 1997.

OECD. The Validation of Test Methods Considered for Adoption as OECD Test Guidelines. **ENV/MC/CHEM** (98) 6. Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998.

ULTEE, A.; BENNIK, H. J.; AND MOEZELNAR, R., 2002. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen, *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, 3: 1561-1568.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; AND SMID, E. J., 1999. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied Environmental Microbiology**, 65: 4606-4610.