

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e dermatófitos.

Anelise Oliveira da Silva Fonseca

Anelise Oliveira da Silva Fonseca

Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e Dermatófitos.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal – Veterinária Preventiva).

Orientador: Mário Carlos Araújo Meireles

Co-Orientadora: Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2011

**Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)**

F676a Fonseca, Anelise Oliveira da Silva

Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e Dermatofitos / Anelise Oliveira da Silva Fonseca ; orientador Mário Carlos Araújo Meireles; co-orientador Daniela Isabel Brayer Pereira. Pelotas,2011.-43f. - Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Faculdade de Veterinária . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2011.

1.*Pythium insidiosum* 2.Dermatofitos 3.*Origanum vulgare* 4.*Rosmarinus officinalis* I Meireles, Mário Carlos Araújo(orientador) II .Título.

CDD 633.81

Banca Examinadora:

Profª Drª Melissa Orzechowski Xavier

Profª Drª Patrícia da Silva Nascente

Profº Drº Luiz Filipe Damé Schuch

Profº Drº Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por me dar a família maravilhosa e incentivadora que tenho.

Agradeço muito a minha mãe e meu pai que desde a infância me deram muito incentivo para que eu estudasse, e fizeram tudo que podiam e mais um pouco pra me ajudar nesta trajetória.

Aos meus amores de hoje, amanhã e sempre meu marido Toni e minha filhotinha Isadora, que suportaram todo meu mau humor, preocupações e ausências.

Ao meu orientador Prof. Mário Meireles, pela confiança.

As professoras Dr^a Marlete Brum Cleff e Dr^a Daniela Isabel Brayer Pereira, pela orientação, incentivo e amizade.

As amigas e colegas do Laboratório de Micologia, Ana Paula, Flávia, Rosema, Isabel, Angelita, Luiza, Tati (laboratorista e grande amiga), entre tantas outras.

Aos bolsistas Ângela, Iara, Franklin, Emanoele, Laura, Alexandra e Stefani, pela ajuda e amizade.

Ao meu tio Fábio que esta sempre pronto para ajudar com probleminhas no meu PC (que são muitos).

Ao CNPq e CAPES pela bolsa de estudo e recursos financeiros disponibilizados que tornaram este projeto possível.

RESUMO

Fonseca, Anelise Oliveira da Silva – **Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e Dermatófitos.** 2011.42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas.

O presente estudo teve como objetivos determinar a composição química e avaliar a ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Os óleos foram analisados por cromatografia gasosa e identificados por comparação com o tempo de retenção de padrões. A avaliação da atividade antifúngica foi realizado o método de microdiluição em caldo, sendo utilizados nove isolados de dermatófitos e nove isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de casos clínicos em animais. Os óleos foram submetidos a uma série de dez diluições em logaritmo de base 2, no meio RPMI 1640, obtendo-se concentrações de 30- 0,03µl/mL. As microplacas foram incubadas a 32°C por 72 h e a susceptibilidade foi expressa pela concentração inibitória mínima (CIM). Os principais constituintes dos óleos de *R. officinalis* foram cânfora (51,52%), verbenona (11,84%), 1,8-cineol (8,94%), mirceno (4,50%), α-terpineol (4,39%) e borneol (2,68%) e para o *O. vulgare* foram 4-terpineol (27,67%), gama-terpineno (4,10%), timol (0,58%) e carvacrol (21,58%). Para os Dermatófitos o CIM do *R. Officinallis* variou entre 30 a 3 µl/ml e para o *O. vulgare* variou entre 3 a 0,3 µl/mL. No caso do *P. insidiosum* o CIM do *R. Officinallis* variou entre 3 a 1,5 µl/ml e para o *O. vulgare* variou entre 3 a 0,75 µl/mL. De acordo com os resultados obtidos, pode-se afirmar que o óleos testados apresentam atividade antifúngica em dermatófitos e *P. insidiosum*. Os resultados estimulam novos estudos, especialmente em relação a *P. insidiosum*, já que ainda não está disponível nenhum tratamento eficaz.

Palavras chave: *Pythium insidiosu*. dermatófitos. *Origanum vulgare*. *Rosmarinus officinalis*.

ABSTRACT

Anelise Oliveira da Silva Fonseca - **Antifungal action of essential oils of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against isolates of *Pythium insidiosum* and Dermatophytes.** 2011.42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas

This study aimed to determine the chemical composition and evaluate the antifungal essential oils of *Origanum vulgare* (oregano) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). The oils were analyzed by gas chromatography and identified by comparison with the retention time of standards. To evaluate the antifungal activity method was used in broth, and used nine isolates of dermatophytes and nine isolates of *Pythium insidiosum* from clinical cases in animals. The oils were subjected to a series of ten dilutions in logarithm base 2, in RPMI 1640, resulting in concentrations from 30 to 0,03 μmL^{-1} . The microplates were incubated at 32°C for 72 h and susceptibility was expressed by the minimum inhibitory concentration (MIC). The main oil constituents *R. officinalis* were camphor (51.52%), verbenone (11.84%), 1,8-cineole (8.94%), myrcene (4.50%), α -terpineol (4.39%) and borneol (2.68%) and *O. vulgare* were 4-terpineol (27.67%), gamma-terpinene (4.10%), thymol (0.58%) and carvacrol (21.58%). For dermatophytes the MIC *R. Officinallis* ranged from 30 to 3 $\mu\text{l/mL}$ and *O. vulgare* varied from 3 to 0.3 $\mu\text{L/ml}$. In the case of *P. insidiosum* MIC *R. Officinallis* ranged from 3 to 1.5 $\mu\text{l/mL}$ and *O. vulgare* varied from 3 to 0.75 $\mu\text{l/mL}$. According to the results obtained, it can be argued that the tested oils have antifungal activity on dermatophytes and *P. insidiosum*. The results should stimulate further research, especially in relation to *P. insidiosum*, as yet no effective treatment is available.

Keywords: *Pythium insidiosum*. dermatophytes. *Origanum vulgare*. *Rosmarinus officinalis*.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Cromatograma do óleo essencial de orégano: 1 *a*-tujeno, 2 *a*-pineno, 3 sabineno, 4 *b*-pineno, 5 mirceno, 6 *a*-felandreno, 7 *a*-terpineno, 8 *p*-cimeno, 9 limoneno, 10 1,8-cineol, 11 *cis/trans* β -ocimeno, 12 *g*-terpineno, 13 *trans* sabineno hidratado, 14 terpinoleno, 15 *cis* sabineno hidratado, 16 linalol, 17 *trans-p*-mentenol, 18 *cis-p*-mentenol, 19 borneol, 20 4-terpineol, 21 *a*-terpineol, 22 *trans*-piperitol, 23 *cis*-piperitol, 24 éter do metil timol, 25 éter do metil carvacrol, 26 acetato de linalila, 27 geraniol/ nerol, 28 timol, 29 carvacrol, 30 acetato de geranila/nerila, 31 *b*-cariofilleno, 32 germacreno, 33 espatulenol e 34 óxido de cariofileno..... 28
- Figura 2: Cromatograma do óleo de Alecrim: 1 *a*-pineno, 2 canfeno, 3 mirceno, 4 *b*-pineno, 5 *a*-terpinene, 6 *p*-cimeno, 7 limoneno, 8 1,8-cneol, 9 *g*-terpineno, 10 terpineno, 11 linalol, 12 crisantenina, 13 cânfora, 14 borneol, 15 4-terpineol, 16 *a*-terpineol, 17 verbenona, 18 acetao de bornila, 19 *b*-cariofileno, 20 *a*-humuleno e 21 *a*-copaeno. 28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Concentração Inibitória Mínima dos óleos de <i>R. officinalis</i> e <i>O. vulgare</i> em a amostras de dermatófitos isoladas de animais e isolado padrão.....	29
Tabela 2:Concentração Inibitória Mínima dos óleos de <i>R. officinalis</i> e <i>O. vulgare</i> frente a isolados de <i>P. insidiosum</i>	30

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
2.1	Óleos essenciais	12
2.2	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>).....	13
2.3	Orégano (<i>Origanum vulgare</i>).....	15
2.4	Pitiose (<i>Pythium insidiosum</i>).....	16
2.5	Dermatofitose	20
3	METODOLOGIA	23
3.1	Extração dos óleos essenciais.....	23
3.2	Análise Cromatográfica	23
3.3	Isolados de <i>P. insidiosum</i> e Dermatofitos utilizadas	24
3.4	Preparo dos inoculos	24
3.4.1	Dermatófitos	24
3.4.2	<i>Pythium insidiosum</i>	25
3.5	Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i>	25
4	RESULTADOS.....	27
4.1	Extração dos óleos essenciais.....	27
4.2	Suscetibilidade dos dermatofitos	29
4.3	Suscetibilidade de <i>Pythium insidiosum</i>	30
5	DISCUSSÃO	31
6	CONCLUSÃO	35
	REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos. Os produtos vegetais apresentam uma gama de diversidades em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (CASTRO; CHEMALE, 1995; CLEFF, 2008; PINTO et al., 2002; YUNES; CALIXTO, 2001)

Dados da Organização Mundial da Saúde demonstram que em torno de 80% da população mundial utiliza espécies de plantas para melhoria ou tratamento de sinais e/ou sintomas de patologias (ARAÚJO et al 2003). Porém, nas últimas décadas, houve um ressurgimento do interesse nas plantas como fonte de novos agentes terapêuticos (CLEFF, 2008; GUERRA; NODARI, 2003; YUNES; CALIXTO, 2001). Aliado a este fato, os estudos das atividades terapêuticas das plantas medicinais obtiveram grande impulso através do desenvolvimento da química orgânica, que possibilitou modificar a estrutura dos produtos naturais, tendo em vista um aumento na atividade ou seletividade e a redução dos efeitos adversos e toxicidade (CORDELL;QUINN-BEATTIE;FARNSWORTH., 2001).

Neste contexto, os óleos essenciais de plantas tem se destacado devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas apresentadas em diversos ensaios (CARDOSO et al. 2000, HENTZ; SANTIN,2007). Embora a utilização maior ocorra nas áreas de alimentos (condimentos e aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfumes e produtos de higiene), os óleos essenciais também têm sido utilizados na indústria farmacêutica (MATTOS; MATTOS, 1986)

Estudos demonstram que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresenta ação antibacteriana. Já a infusão desta planta pode ser utilizada no tratamento de sintomas digestivos, por suas propriedades antiespasmódica e coleréticas (BRISOLARA, 2007). Além disso, tem sido demonstrado potencial

antimicrobiano dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* frente a fungos filamentosos, leveduras e bactérias (CLEFF et al., 2010^a; SAEED; TARIQ, 2009; SANTURIO et al., 2007).

Dentre os crescentes relatos de infecções fúngicas nos animais domésticos, destacam-se como importantes agentes os dermatófitos por causarem micoses cutâneas, tendo importância marcada pelo seu potencial zoonótico e facilidade de transmissão e *Pythium insidiosum* por determinar um quadro clínico de evolução rápida, especialmente nos equinos, além de não estar disponível nenhum quimioterápico com eficácia comprovada frente ao agente (BALDA; OTSUKA; LARSSON, 2007; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; MEIRELES et al., 1993).

Apesar do amplo espectro de ação dos antifúngicos sobre dermatófitos, alguns autores relatam resistência e recorrência da micose, consistindo-se em um problema clínico e de saúde pública (PERES et al., 2010). Além disto, a problemática referente a terapia antifúngica para *P. insidiosum* justifica a procura por alternativas terapêuticas economicamente viáveis, com baixa toxicidade e com efetividade frente a estes microrganismos. Diante desta problemática, os óleos essenciais de alecrim e orégano podem constituir-se numa alternativa interessante, uma vez que apresentam atividade antimicrobiana frente a bactérias e leveduras. Diante do exposto, os objetivos do presente estudo foram:

Determinar a composição química dos óleos essenciais de *R. officinalis* e *O. vulgare*;

Avaliar a suscetibilidade de isolados clínicos de fungos dermatófitos e do oomiceto *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *R. officinalis* e *O. vulgare*.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Óleos essenciais

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; APPELT; FERREIRA, 2001).

Os óleos essenciais, também chamados óleos voláteis ou óleos etéreos (MATTOS; MATTOS, 1986; SIMÕES; SPITZER, 2002), recebem essas denominações devido a algumas de suas características físico-químicas, como: apresentação geralmente líquida, de aparência oleosa e evaporam quando expostos ao ar em temperatura ambiente (ROBBERS; SPCEDIE; TYLER,1997; SIMÕES; SPITZER, 2002).

A grande maioria dos óleos essenciais é constituída de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que esses últimos são predominantes na composição (ROBBERS; SPCEDIE; TYLER,1997). Dessa forma, os óleos podem ser constituídos de quase todos os tipos de compostos orgânicos, como álcoois simples e terpênicos, cetonas, aldeídos, éteres, óxidos, ésteres, fenóis, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e até compostos com enxofre (ROBBERS; SPCEDIE; TYLER,1997; SIMÕES; SPITZER, 2002). Os óleos voláteis comumente apresentam em torno de duzentos componentes, sendo muitas vezes os componentes vestigiais os responsáveis pelo aroma, podendo estes ser afetados pela ausência de apenas um dos compostos. Poucos são os óleos que possuem apenas um único componente em alta percentagem, além disso, plantas da mesma espécie, provenientes de diferentes partes do mundo, em geral têm os mesmos constituintes, porém percentagens em que estão presentes podem diferir consideravelmente (ROBBERS; SPCEDIE; TYLER,1997)

Os métodos de extração de óleos essenciais variam conforme a localização do óleo volátil na planta e com a proposta de utilização do mesmo. As técnicas mais utilizadas para a extração são o arraste a vapor, uso de solventes orgânicos e fluido supercrítico (SIMÕES; SPITZER 2002). A destilação com arraste de vapor de água ou hidrodestilação, pode ser realizada deixando o material a ser extraído em contato direto com água fervente ou passando uma corrente de vapor de água, com ou sem pressão, através do recipiente onde está o material a ser extraído (RODRIGUES, 2002). Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Cleavenger, que oferece algumas vantagens em relação à destilação convencional, como ser mais compacto e permitir determinações mais precisas do teor de óleo, além de ser recomendado pela Farmacopéia Brasileira (RODRIGUES, 2002; SIMÕES; SPITZER 2002).

Estudos acerca do mecanismo de ação dos óleos essenciais têm sido realizados, embora ainda de forma incipiente. Segundo Lambert et al. (2001) em pesquisa envolvendo bactérias Gram negativas os compostos terpênicos demonstram tornar a membrana celular permeável, em consequência levando à destruição da membrana externa e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática ao ATP (Trisfosfato de Adenosina). Helander et al. (1998) sugerem um mecanismo de quelação de cátions diferente na membrana externa dos microrganismos o que poderia contribuir com esta ação, sendo que a avaliação de diferentes concentrações de eugenol demonstraram a inibição da produção de amilase e protease por *B. cereus*, degradação da parede celular e consequente lise celular bacteriana (THOROSKI; BLANK; BILIADERIS, 1989).

2.2 Alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

O *R. officinalis* L. pertence à família botânica *Lamiaceae*, antiga *Labiatae* (JOLLY, 1995; UPNMOOR, 2003) que possui 200 gêneros com aproximadamente 3200 espécies (JOLLY, 1995). As partes utilizadas das plantas são as folhas e as sumidades floridas, de onde é obtido o óleo essencial (CARVALHO; ALMANÇA, 2003). Porém, a planta também pode ser utilizada *in natura*, na preparação de infusões, ou na aromatização de fórmulas destinadas ao uso oral (HENTZ; SANTIN, 2007).

O óleo essencial do alecrim é usado para reumatismo, eczema, úlcera, tratamento de feridas. Bem como pode ser administrado com a finalidade de

estimulante do sistema nervoso central, inseticida e antisséptico bucal (LORENZI; MATOS, 2002, PORTO; GODOY, 2001; SOLIMAN et al, 1994;). Em forma de infusão as folhas são empregadas com ação carminativa, gástrica, abortiva e antiespasmódica (MAY et al. 2010) assim como anticonvulsivante e hepatoprotetora (PORTO; GODOY, 2001; SENA et al, 1993).

R. officinalis tem sido foco de muitos estudos quanto a sua composição química e suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, especialmente em relação ao óleo essencial (SAITO; SCRAMIN, 2000). Este é constituído por hidrocarbonetos monoterpênicos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol, terpineol, 3-octanona e acetato de isobornila e por terpenoides, representados pelo carnosol, ácido carnosílico, oleânico, ursólico, entre outros (SILVA, 2008).

Pesquisas realizadas com óleo volátil de *R. officinalis* confirmam sua importância em saúde pública, uma vez que por sua natureza lipofílica interfere nas funções metabólicas básicas, bioquímicas, fisiológicas e comportamentais dos insetos, principalmente de mosquitos vetores da malária, febre amarela e dengue (TIGRINE-KORDJANI; CHEMAT; MEKLATI, 2006).

O alecrim, segundo alguns autores, pode apresentar contra-indicações, uma vez que pode provocar alterações no sono, bem como irritações gastrintestinais e nefrite quando em doses elevadas. Em gestantes, pode provocar aborto por estimular as contrações uterinas (CARDOSO et al., 2000, VEIGA JUNIOR, 2008).

Sá et al. (2006) em estudo com ratos Wistar analisou a ocorrência de toxicidade do óleo essencial de *R. officinalis* em órgãos vitais e na espermatogênese utilizando doses de 291,2mg/Kg e 583,4mg/Kg por 5 dias, em ambas as doses não foi relatado alterações significativas nos órgãos e na espermatogênese.

A ação antimicrobiana do óleo essencial do alecrim tem sido avaliada em diferentes espécies de bactérias e fungos. Na área médica espécies do gênero *Candida* isoladas da mucosa vaginal de mulheres tem sido usadas em testes de suscetibilidade com óleos essenciais do alecrim com resultados satisfatórios (BICCHI et al., 2004).

Estudos *in vitro*, feitos por Cleff et al. (2007), utilizando isolados do gênero *Candida* frente a óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *R. officinalis* L. mostraram suscetibilidade aos óleos, havendo variações na concentração inibitória mínima (CIM), conforme o isolado. Em outro estudo Costa (2009) testou os extratos glicólicos de *R. officinalis* e *Syzygium cumini* frente a vários isolados de *Candida*

sendo que *C. albicans* e *C. glabrata* se mostraram mais resistentes ao extrato que *C. tropicalis*.

2.3 Orégano (*Origanum vulgare*)

O gênero *Origanum* pertence à família *Lamiaceae*, que é composta por três grupos, 38 espécies, seis subespécies e 17 híbridos, sendo caracterizado por uma larga diversidade morfológica e química (ARCILA-LOZANO et al., 2004; CLEFF, 2008; KOKKINI; KAROUSOU; VOKOU; 1994).

O orégano é uma planta de origem mediterrânea, perene que se adapta bem em solos secos e calcários (CASTRO; CHEMALE, 1995; SIMÕES; SPITZER, 2002). Nas Américas foi introduzido pelo homem para ser utilizado principalmente como tempero, sendo que o principal produtor de orégano na América do Sul é o Chile, seguido pela Bolívia e Peru, tendo a Argentina e Uruguai menor escala de produção (ARCILA-LOZANO et al., 2004; CASTRO; CHEMALE, 1995; TSINAS, 1999).

O orégano tem um aroma característico, próprio de plantas que em sua constituição produzem uma quantidade relativamente alta de carvacrol (fenol não cristalizável) e timol. Assim, o óleo essencial produzido pelo orégano é rico nesses fenóis (KOKKINI; KAROUSOU; VOKOU, 1994; SIMÕES; SPITZER, 2002).

Estudos variados demonstram que a composição do óleo essencial do orégano varia conforme alguns fatores tais como, localização geográfica, época da colheita, estação do ano, variedade e espécie, solo, estágio de crescimento da planta, além do método de extração (KOKKINI; KAROUSOU; VOKOU, 1994; SIMÕES; SPITZER, 2002; VAGI et al., 2005).

A alta concentração dos fenóis e sua inter-relação são de grande importância para a eficácia do produto, pois estudos demonstram que a eficácia de compostos isolados, como timol e carvacrol, não alcançam a mesma eficácia do óleo essencial (ARCILA-LOZANO et al., 2004).

Em vista da diversidade de compostos químicos, o orégano tem sido estudado em busca de propriedades antioxidantes, tanto sob a forma de óleo ou de extrato (hexânico, cetônico, ou metanólico), como do emprego direto de suas folhas (VAGI et al., 2005). Saeed e Tariq (2009) avaliando a forma de uso do orégano frente a bactérias gram-positivas concluíram que a atividade antibacteriana da infusão e do óleo essencial foi superior à decocção, que não apresentou ação antimicrobiana.

Observando relatos científicos acerca do potencial antimicrobiano de especiarias, o orégano vem apresentado resultados de destaque como agente de inibição de bactérias e fungos (SOUZA et al., 2005). O óleo essencial de orégano em testes *in vitro* mostrou ação antifúngica frente ao *Sporothrix schenckii*, leveduras do gênero *Candida* e fungos do gênero *Aspegillus* (CLEFF et al, 2010^b). Helal; Stelato (2009) assim como Cleff (2008) testaram várias amostras de orégano e observaram diferenças na atividade antifúngica do óleo conforme marca e lote.

Pozzatti et al. (2008), em estudo com varias espécies de *Candida* frente a óleos essenciais de plantas como tomilho, orégano, alecrim e gengibre verificaram que os isolados que se apresentavam resistentes ao fluconazol eram sensíveis aos óleos essenciais. Por outro lado, no mesmo estudo observaram que os isolados apresentaram diferenças de sensibilidade nos diferentes óleos, sendo o orégano e alecrim os mais eficazes.

Santurio et al (2007) avaliaram três óleos essenciais (orégano, tomilho e canela) frente a 60 amostras de *Salmonella* isoladas de carcaça de aves, sendo que o orégano apresentou CIM de $510\mu\text{l mL}^{-1}$, o tomilho apresentou CIM de $961\mu\text{l mL}^{-1}$ e a canela obteve CIM de $1.335,3\mu\text{l mL}^{-1}$, ficando evidenciado que o orégano foi o que apresentou melhor ação antimicrobiana.

2.4 Pitiose (*Pythium insidiosum*)

O agente etiológico da pitiose é o *P. insidiosum*, pertencente ao Reino Stramenipila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *P. insidiosum* (DE COCK et al., 1987). Dentre as várias espécies de *Pythium* descritas, apenas *P. insidiosum* é capaz de causar doença em animais (MOORE-LANDECKER, 1996).

O gênero *Pythium* caracteriza-se por produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada, e reprodução sexuada oogâmica. Sua parede celular é composta de β – glucanas, celulose e hidroxiprolina. O oomiceto possui talo diplóide e mitocôndria com crista tubular, bem como características moleculares e bioquímicas peculiares, como uma rota alternativa para síntese do aminoácido lisina (MOORE-LANDECKER, 1996). *P. insidiosum* é um microrganismo aquático que para a produção de zoósporos necessita de temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água em banhados e lagoas (MILLER; CAMPBELL, 1982).

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (GROOTERS, 2003, MEIRELES et al., 1993; SANTURIO et al., 1998), e tem sido relatada nas Américas, alguns países da europeus, sudoeste da asiático, Oceania e África (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995; FOIL,1996; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS; 1996; RIVIERRE et al., 2005).

A pitiose é uma doença crônica, piogranulomatosa, frequentemente observada em equinos e mais raramente em caninos. Casos esporádicos também têm sido relatados em bovinos, felinos, ovinos, aves e espécies selvagens mantidas em cativeiro, como jaguar, urso e camelo (SANTURIO et al., 2006). Em humanos, é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum no sudeste da Ásia (KRAJAEJUN et al., 2006).

A espécie equina é a mais afetada principalmente nas formas cutâneas e subcutâneas, nestes animais a enfermidade caracteriza-se pelo desenvolvimento de granulomas eosinofílicos de difícil tratamento, com presença de massas necróticas denominadas “kunkers” (MEIRELES et al., 1993; MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al., 1996; MILLER; CAMPBEL, 1982). Os caninos são a segunda espécie mais atingida e as infecções manifestam-se como piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (GROOTERS, 2003). Em humanos, apresenta-se na forma oftálmica, subcutânea e sistêmica, sendo as duas últimas associadas á α - β talassemias, comuns no sudoeste da Ásia (IMWIDTHAYA, 1994; LEAL et al. 2001).

A pitiose equina é uma doença que ocorre em todas as regiões do Brasil, principalmente no Pantanal, onde há relação direta com o período das chuvas (outubro-março), acarretando prejuízos significativos, direta ou indiretamente (LEAL et al., 2001). O primeiro relato da enfermidade nesta espécie foi realizado por Santos e Londero (1974), ao avaliarem a histopatologia de lesões tumorais do tecido subcutâneo de equinos no Rio Grande do Sul.

Em equinos as lesões cutâneas mais frequentes atingem principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede tóraco-abdominal, provavelmente devido ao maior tempo de contato destas regiões corpóreas com água contaminadas com zoósporos (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995; FOIL, 1996; LEAL et al., 2001; MILLER; CAMPBEL, 1982).

A enfermidade caracteriza-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando grandes massas teciduais, com bordas irregulares e hifas recobertas por células necróticas, formando massas branco-amareladas, semelhante a corais

(kunkers), que variam de 2 a 10 mm de diâmetro, tendo forma irregular, ramificada e aspecto arenoso, penetrando no tecido granular (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995; MEIRELES et al., 1993).

Em caninos a forma gastrintestinal é a mais comum e manifesta-se com distúrbios digestivos, tais como vômito, anorexia crônica, perda de peso, diarreia e presença de massas nodulares, quando submetidos a palpação abdominal (GROOTERS, 2003). Os cães afetados são normalmente oriundos de regiões rurais ou estiveram, esporadicamente, em locais alagados como açudes e banhados (FISCHER et al., 1994; FOIL et al., 1984).

As infecções por *P. insidiosum* em humanos pode apresentar-se de três formas: forma cutânea, através de lesões granulomatosas no tecido subcutâneo de pacientes talassêmicos; pela forma sistêmica, caracterizada por desenvolvimento de artrite crônica, trombose arterial e gangrena, atingindo geralmente a extremidade dos membros inferiores de pacientes talassêmico; e na forma de queratite, podendo ou não estar associada à talassemia (IMWIDTHAYA, 1994). No Brasil a pitiose teve seu primeiro relato em humanos no ano de 2005, na forma cutânea (BOSCO et al., 2005).

O tratamento da pitiose em animais e humanos apresenta dificuldades em função das características peculiares do *P. insidiosum*, sobretudo pela sua composição de parede celular e ausência de ergosterol na membrana citoplasmática, o que explica os resultados desanimadores com terapias antifúngicas, uma vez que o ergosterol constitui o componente alvo de ação da maioria dos fármacos antifúngicos (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003; SATHAPATAYAVONGS et al., 1989). Associado a esse fato, em muitos casos o sucesso das terapias também pode ser influenciado pelo tamanho, tempo da lesão, idade e estado nutricional do animal (MILLER, 1981).

A terapia da pitiose equina utilizando fármacos antifúngicos como anfotericina B foi realizada por McMullan et al. (1977). Os autores obtiveram 50% de eficácia no tratamento quando anfotericina B foi associada à remoção cirúrgica. No entanto, somente 30% dos animais responderam a terapia com anfotericina B isolada e 20% não responderam aos tratamentos. Segundo Gonzáles et al. (1979) o tratamento das ficomicoses subcutâneas é incrementado quando iodeto de potássio é usado após a extirpação cirúrgica da lesão. Entretanto, Meireles et al. (1993) não obtiveram sucesso em dois equinos tratados com iodeto de potássio endovenoso, mesmo

quando associado à cirurgia. Na pitiose canina nenhuma das terapias antifúngicas propostas apresentou resultados satisfatórios. Entre os fármacos testados destacam-se a anfotericina B, fluconazol, cetoconazol e itraconazol (DYKSTRA et al, 1999; ENGLISH; FROST, 1984; FOIL et al., 1984; JAEGER; ROTSTEIN;LAW, 2002; RIVIERRE et al., 2005). No estudo realizado por Sekhon, Padhye e Garg (1992) os poliênicos anfotericina B e seus análogos não apresentaram atividade satisfatória, enquanto os azólicos fluconazol, cetoconazol e miconazol inibiram os isolados de *P. insidiosum* testados *in vitro*, com o miconazol apresentando os melhores resultados, seguido do cetoconazol. PEREIRA et al. (2007) ao avaliarem a suscetibilidade de 27 isolados de *P. insidiosum in vitro* e *in vivo* frente a acetato de caspofungina evidenciaram apenas atividade fungistática do fármaco. Já Argenta et al. (2008) ao testarem a atividade *in vitro* de voriconazol, itraconazol e terbinafina frente a 30 isolados clínicos de *P. insidiosum*, evidenciaram que a associação de terbinafina mais voriconazol ou terbinafina mais itraconazol foram sinérgicas em 17% dos isolados avaliados. Similarmente, Cavalheiro et al. (2009) demonstraram que as combinações de terbinafina com anfotericina B, metronidazol, rifampicina, ibuprofeno e fluvastatina podem ser benéficas, uma vez que podem trazer sinergismo na ação destas drogas contra o *P. insidiosum*.

Estudos *in vitro* e *in vivo* avaliando a ação de compostos fitoterápicos sobre *P. insidiosum* não tem sido desenvolvidos. Entretanto, estudos com outras espécies de *Pythium* têm sido relatados. TAIRA et al. (1994) avaliaram a ação de *Alpinia speciosa* nas concentrações de 100 e 1000ppm frente a *Pythium* sp e *Corticium* sp, evidenciando a ação inibitoria da planta ao *Pythium* na concentração de 100ppm. Da mesma forma, Pérez-Sánchez et al. (2007), ao avaliarem a suscetibilidade de *Pythium irregulare*, entre outros fitopatógenos, frente ao óleo essencial de *Thymus zygis* nas concentrações de 0,06; 0,12; 0,25 e 0,5%, evidenciaram que *P. irregulare* mostrou-se sensível ao óleo em todas as concentrações testadas.

O óleo essencial de orégano e alecrim assim como varios outros óleos foram testados frente à fitopatógenos, sendo um deles *Pythium ultimum*. Neste estudo, apenas o óleo de orégano se mostrou eficaz. Já o alecrim não apresentou ação contra nenhum dos microorganismos avaliados (LEE et al., 2007). Similarmente, Wogiatzi et al. (2009) em estudo com *Pythium* spp evidenciou sensibilidade ao orégano.

Zambonelli et al. (1996) ao testarem a ação antifúngica dos óleos essenciais de tomilho, lavanda e menta frente a *P. ultimum*, demonstraram que o tomilho apresentou CIMs de 200ppm, enquanto a menta e a lavanda apresentaram CIMs de 400ppm, ficando evidenciada a melhor atividade do tomilho sobre este fitopatógeno. Os estudos de BRUNI et al. (2003) com óleo essencial de quebra queixo (*Ocotea queixos*) frente a *P. ultimum* demonstraram que essa planta apresentou uma boa ação antimicrobiana. Alternativamente, KUMAR et al. (2007) evidenciaram CIMs de 100µg/mL do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* contra *Pythium debarynum*.

2.5 Dermatofitose

Os dermatófitos pertencem a três gêneros que são *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, que se reproduzem de forma assexuada através de macroconídios e microconídios, e pertencem, em seu estado anamórfico, a subdivisão Deuteromycota, classe Hyphomycetes, ordem Hyphomycetales. As principais espécies representantes destes gêneros são *M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *T. verrucosum* e *E. floccosum* entre outros, os dermatófitos são fonte de zoonoses e de fácil disseminação, sendo considerados problemas de saúde pública (LACAZ et al., 2002, SIDRIM; MOREIRA, 1999; MEDEIROS et al., 2009).

As dermatofitoses são afecções cutâneas caracterizadas por lesões superficiais em tecidos queratinizados como unhas, garras, pêlos e pele. Estas enfermidades são causadas pelo parasitismo de fungos denominados dermatófitos que são classificados quanto a sua origem em geofílicos, antropofílicos e zoofílicos quando encontrados respectivamente no solo, humanos e animais (DIAZ; SALAMANCA; PIONTELLI, 1984; LACAZ et al., 2002).

M. canis tem sido considerado o principal agente de micoses em cães e gatos e o mais frequente dermatófito zoofílico de humanos (CABAÑES, 2000; SIMPANYA; BAXTER, 1996). Seguido de *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* (BRILHANTE et al., 2003; GAMBALE et al., 1987; GAMBALE et al., 1993; LARSSON 1980). A espécie felina tem sido considerada como reservatório do *M. canis* apresentando-se como portadores assintomáticos, constituindo-se desta forma, uma

fonte de infecção para os homens e outros animais (PINHEIRO; MOREIRA; SIDRIM, 1997; TOSTES, GIFFRIDA, 2003). Machado, Appelt e Ferreira (2004) em um estudo com 250 cães portadores de dermatopatias demonstraram que 50,4% das amostras apresentaram-se positivas para presença de fungos, sendo destas 20,8% patogênicos, entre eles *Malassezia pachydermatis* (13,2%), *M. canis* (5,6%) e *M. gypseum* (2,0%).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, os dermatófitos afetam cerca de 25% da população mundial. Estima-se que 30 a 70% dos adultos sejam portadores assintomáticos desses patógenos. (PERES et al., 2010).

Estudos demonstram que a incidência e prevalência da dermatofitose varia conforme o clima e reservatórios naturais, sendo observado que o clima quente e úmido favorece a presença de algumas espécies (MEINERZ; ROSA, 2009).

As diferentes manifestações clínicas observadas nos animais se devem a resposta do hospedeiro ao dermatófito e a espécie fúngica envolvida na infecção (SANTOS; COELHO; NAPPI, 2002). Quanto mais adaptado ao hospedeiro estiver o fungo menor será a resposta inflamatória, como no caso do parasitismo por dermatófitos antropofílicos que induzem uma resposta inflamatória mais grave nos animais (TANI et al., 2007). Entretanto alguns sinais clínicos são comuns nas infecções dermatofíticas. Balda et al. (2004) cita que em cães com dermatofitose há uma predominância de alopecia, crostas melicéricas ou hemorrágicas, eritema e escamas apresentando-se mais frequentemente na região cefálica e tronco, seguindo o mesmo padrão em felinos. As lesões alopécicas causadas pela dermatofitose podem ser circulares ou irregulares com caspas, crostas e pêlos quebradiços (MEINERZ; ROSA, 2009). Ainda pode ocorrer alopecia disseminada e hiperqueratose com pouca evidencia de inflamação (SOUZA et al., 2002, MEDEIROS et al, 2009).

Os testes laboratoriais são muito úteis no diagnóstico da dermatofitose, onde o exame direto é a etapa inicial do processamento laboratorial (BRILHANTE et al., 2003). O isolamento primário é uma etapa indispensável na identificação do agente etiológico, este é preparado simultaneamente ao exame direto, onde amostras de pêlos e escamas de pele são semeadas em meios de cultura ricos em glicose e peptona e incubados entre 25°C e 30°C. Nas cepas dermatofíticas, as colônias são visualizadas após sete a quinze dias de incubação, no momento que colônias são detectadas, segue-se para a análise das características macromorfológicas, onde

são levados em consideração coloração de verso e reverso, relevo, textura, bem como a presença ou ausência de pigmento (SIDRIM; MOREIRA, 1999).

Em cães e gatos a dermatofitose quase sempre sofre regressão espontânea dentro de 4 a 6 meses. Animais com dermatofitose generalizada necessitam de tratamento intensivo, gatos de pêlo longo podem sofrer regressão espontânea, porém pode levar um tempo médio de um ano e meio a quatro anos (ARANTE et al., 2003). O tratamento de eleição para casos de dermatofitose em animais de companhia são cremes e loções à base de cetoconazol, miconazol, clotrimazol, tiobendazol, terbinafina e clorexidina sendo estes associados ou não a glicocorticoides (MEINERZ; ROSA, 2009). Em casos onde não ocorra resposta ao tratamento tópico pode ser utilizado tratamento sistêmico com griseofulvina, terbinafina e antifúngicos do grupo dos azóis, sendo este um tratamento longo no qual o fármaco deve ser administrado até duas semanas após cura clínica ou após cultura negativa (MEINERZ; ROSA, 2009).

Souza et al. (2010) em estudo com óleo essencial de orégano e manjerona frente a *Tricophyton rubrum*, *Tricophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* e *Microsporum canis*, pelo método de difusão em meio sólido, demonstraram que os isolados de *T. rubrum* e *M. canis* apresentaram CIM de 80 µl/mL para o orégano e resistência a todas as concentrações testadas do óleo de manjerona. Já *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* apresentaram CIM de 160 µl/ml para manjerona e resistência ao orégano. Em outro experimento utilizando *R. officinalis* e *Salvia officinalis* frente a *T. mentagrophytes*, *T. tosurans*, *T. rubrum*, *M. canis* e *Epidermophytom floccosum*, foi observado que ambos os óleos apresentaram ação antifúngica significativa (BOZIN et al, 2007). Adam et al. (1998), ao testar os óleos de menta, lavanda, orégano e sálvia contra *T. rubrum*, obtiveram CIM de 0,25 µl/mL para orégano e menta, 1 µl/mL para lavanda e 2 µl/mL para sálvia. A atividade do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* foi testada por Ribeiro et al. (2007) frente a *T. mentagrophytes*, *M. gypseum*, *T. rubrum* e *M. canis*, os quais evidenciaram CIMs de 62,5 µl/mL; 31,3 µl/mL e 125 µl/mL, respectivamente.

3 METODOLOGIA

3.1 Extração dos óleos essenciais

A parte aérea com folhas e galhos de *R. officinalis* (alecrim) foi colhida no mês de março de 2008, na rua Mário Peiruque nº 1446, bairro Bom Jesus, situado no município de Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. O *Origanum vulgare* (Orégano), utilizado no estudo foi da marca “La Rosa”, obtido de distribuidor comercial do Uruguai que forneceu o produto com certificação botânica e de qualidade.

As amostras de *R. officinalis* foram então enviadas ao Departamento de Química Orgânica, Instituto de Química e Geociência da Universidade Federal de Pelotas para secagem em estufa e posterior extração do óleo essencial.

Posteriormente, para obtenção do óleo, 100g de folhas secas do orégano e alecrim foram submetidas à extração por arraste de vapor em aparelho de Cleavenger por um período de 4 h. Após a extração, o óleo era seco em Na₂SO₄ anidro, grau P.A., concentrado sob N₂ ultra puro e armazenado em frasco âmbar, sendo mantido sobre refrigeração a 4°C até a utilização, conforme descrito por Rodrigues, 2002.

3.2 Análise Cromatográfica

Os óleos essenciais obtidos foram analisados por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC/FID-Schimadzu 17A), visando a identificação dos principais constituintes químicos. Foram preparadas soluções (500 µg/ml) dos óleos essenciais, sendo injetado 1µl desta solução no cromatógrafo. Também foi preparada uma solução (40 µg/ml) dos padrões cromatográficos para orégano e alecrim (α -pineno, canfeno, β -pineno, mirceno, α -terpineno, ρ -cimeno, limoneno, 1-8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, linalol, 4-terpineol, α -terpineol, timol, carvacrol, canfora, verbenona e borneol) que foi submetida às mesmas condições da amostra.

Os compostos nas amostras dos óleos essenciais foram identificados por comparação com o tempo de retenção dos padrões terpênicos conforme descrito por Rodrigues et al., 2004.

3.3 Isolados de *P. insidiosum* e Dermatófitos utilizadas

Os 8 isolados de dermatófitos, *Microsporum gypseum* (n=4), *Microsporum canis* (n=3), *Trichophyton mentagrophytes* (n=1), *Trichophyton verrucosum* (n=1) utilizados neste estudo foram obtidos de casos clínicos de pequenos e grandes animais e são pertencentes ao Laboratório de Doenças Infecciosas – Setor Micologia da Faculdade de Veterinária – UFPel. A amostra padrão *Microsporum gypseum* (ATCC 14687) foi cedida pela Fiocruz/Rio de Janeiro. Estas amostras foram isoladas em meio Mycobiotic agar® e mantidas em meio PDA (Potato Dextrose Agar) em geladeira sob temperatura de 4 a 8°C, no Laboratório de Doenças Infecciosas - Setor Micologia da Faculdade de Veterinária - UFPel.

As amostras de *Pythium insidiosum* (n=9) foram provenientes de casos clínicos em equinos oriundos da região de Pelotas/RS e Bagé/RS e pertencentes ao do Laboratório de Micologia/ Instituto de Biologia- UFPel. O isolamento foi realizado em ágar água extrato de levedura e mantidas em tubos contendo o mesmo meio, em temperatura ambiente.

3.4 Preparo dos inoculos

3.4.1 Dermatófitos

Os dermatófitos foram repicados em PDA e mantidos em estufa a 32°C por 10 dias. Após o crescimento, foi realizado exame direto da colônia entre lâmina e lamínula com lactofenol azul de algodão para visualização da presença ou ausência de macro e microconídios. O inoculo foi obtido da seguinte forma: sobre a superfície do crescimento fúngico acrescentou-se 1ml de solução constituída por 100µl de Tween 20 e 0,9 ml de água destilada estéril. Com o auxílio de uma lâmina de bisturi esterilizada era feita a raspagem suave da colônia. Posteriormente, a solução obtida era transferida para um tubo contendo 4 mL de água destilada estéril, permanecendo em repouso por aproximadamente 20 minutos. Após esse período, o inoculo era ajustado em espectrofotômetro com comprimento de onda de 530nm e

70% de transmitância. O inóculo final foi diluído 1:50 em meio RPMI 1640 e, este dispensado em alíquotas de 100µL por poço nas placas de microdiluição.

3.4.2 *Pythium insidiosum*

As amostras de *P. insidiosum* previamente cultivadas em ágar água extrato de levedura foram repicadas para placas de Petri contendo o mesmo meio de cultivo, juntamente com fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavados a 121° C por 20 minutos. As placas foram incubadas por um período de cinco dias à temperatura de 37° C. Após esse período de cultivo, os fragmentos de grama parasitados pelo *P. insidiosum* foram transferidos para uma placa de Petri contendo 30mL de Meio de Indução, composto pela solução A: K₂HPO₄ (1,0 M), KH₂PO₄ (1,0 M), (NH₄)₂HPO₄ (3,66 M), e pela solução B: MgCl₂·6H₂O (0,5 M), CaCl₂·2H₂O (0,5 M). O Meio de Indução era obtido pela mistura de 0,5mL da solução A e 0,1mL da solução B em 1.000mL de água destilada estéril. As placas de Petri contendo o Meio de Indução juntamente com a grama infectada foram incubadas a 37° C, por 24 horas. Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, era realizada a contagem dos mesmos em câmara de Neubauer. O inóculo a ser utilizado foi composto por 1mL do meio de indução, contendo de 10³ a 10⁴ zoósporos/mL e 9mL de RPMI 1640, sendo portanto, utilizado na diluição de 1:10, conforme descrito por Pereira et al. (2007).

3.5 Teste de suscetibilidade *in vitro*

O teste *in vitro* foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com o documento NCCLS M-38 A2 (CLSI) com modificações para utilização em fitofármacos, como a adição de 10 µL de Tween 80 ao óleo essencial para melhor homogeneização.

Os óleos essenciais de *R. officinalis* e *O. vulgare* foram utilizados nas concentrações de 30 a 0,03µl/mL, distribuídos em dez diluições que foram incubadas a 32°C por 48h - 72h. A leitura dos resultados era realizada em 24, 48 e após 72 horas de incubação e considerou o crescimento visual ou não de hifas. A menor concentração capaz de inibir o crescimento dos microrganismos em relação

ao poço controle positivo foi identificada como a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato para os microrganismos testados. Para todas as amostras foram estabelecidos controle positivo (100 μ L de RPMI e 100 μ L de inóculo) e controle negativo (200 μ L de RPMI) e todos os testes foram realizados em duplicata.

4 RESULTADOS

4.1 Extração dos óleos essenciais

O rendimento de cada óleo essencial foi de em média 0,6mL para o orégano e 1mL para o alecrim para cada 100g de folhas secas, demonstrando maior rendimento de óleo de alecrim em relação ao orégano.

Na análise cromatográfica do óleo essencial de *R. officinalis* e de *O. vulgare* foi observadas diferenças entre os constituintes dos óleos obtidos.

Sendo o óleo essencial de orégano os constituintes representaram 75% dos compostos totais, sendo que p-cimeno apresentou concentração de 13,96%, alfa-terpineno de 4,27%, 4-terpineol de 27,67%, gama-terpineno de 4,10%, timol de 0,58% e carvacrol de 21,58% (Figura 1).

Os compostos químicos como cânfora (51,52%), verbenona (11,84%), 1,8-cineol (8,94%), mirceno (4,50%), alfa-terpineol (4,39%) e borneol (2,68%), representaram 84% do óleo essencial de *R. officinalis* analisado por GC/FID (Figura 2).

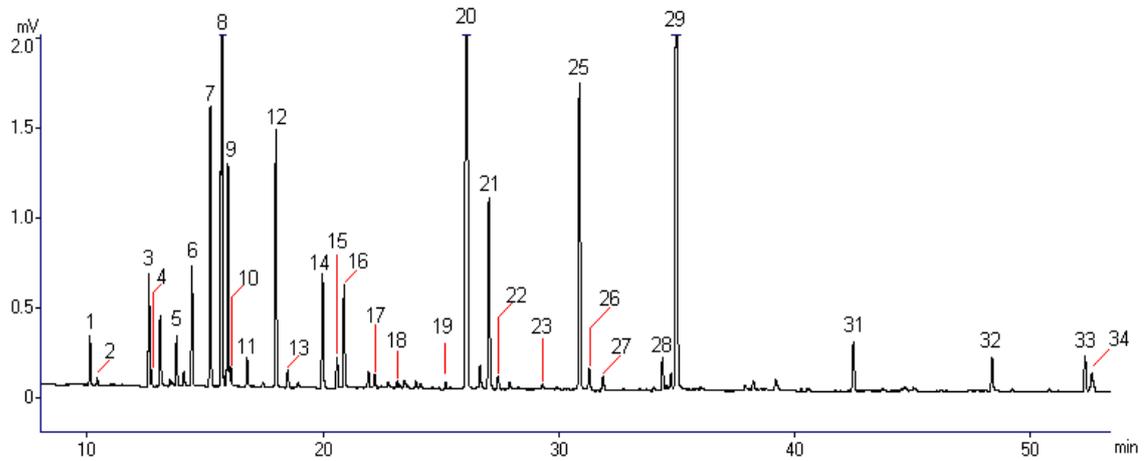


Figura 1: Cromatograma do óleo essencial de orégano: 1 α -tujeno, 2 α -pineno, 3 sabineno, 4 β -pineno, 5 mirceno, 6 α -felandreno, 7 α -terpineno, 8 p -cimeno, 9 limoneno, 10 1,8-cineol, 11 *cis/trans* β -ocimeno, 12 g -terpineno, 13 *trans* sabineno hidratado, 14 terpinoleno, 15 *cis* sabineno hidratado, 16 linalol, 17 *trans-p*-mentenol, 18 *cis-p*-mentenol, 19 borneol, 20 4-terpineol, 21 α -terpineol, 22 *trans*-piperitol, 23 *cis*-piperitol, 24 éter do metil timol, 25 éter do metil carvacrol, 26 acetato de linalila, 27 geraniol/nerol, 28 timol, 29 carvacrol, 30 acetato de geranila/nerila, 31 β -cariofilleno, 32 germacreno, 33 espatulenol e 34 óxido de cariofileno

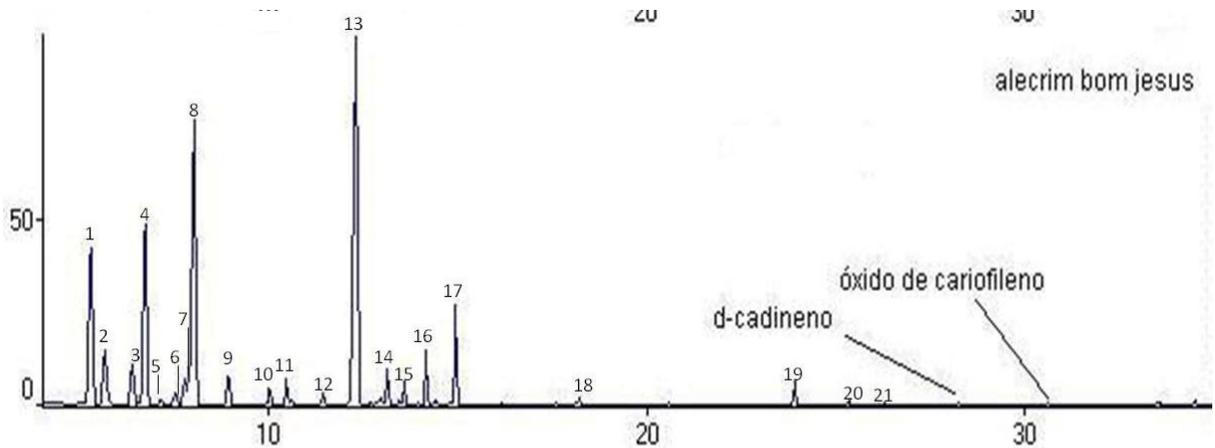


Figura 2: Cromatograma do óleo de Alecrim: 1 α -pineno, 2 canfeno, 3 mirceno, 4 β -pineno, 5 α -terpinene, 6 p -cimeno, 7 limoneno, 8 1,8-cneol, 9 g -terpineno, 10 terpineno, 11 linalol, 12 crisantenina, 13 cânfora, 14 borneol, 15 4-terpineol, 16 α -terpineol, 17 verbenona, 18 acetao de bornila, 19 β -cariofileno, 20 α -humuleno e 21 α -copaeno.

4.2 Suscetibilidade dos dermatófitos

Os resultados das CIM do óleo essencial de *O. vulgare* e *R. officinalis* encontram-se especificados na Tabela 1. Os dados obtidos mostram uma variação nos valores do CIMs, entre 30 e 3 µl/ml para *R.officinalis* e 30 e 0,3 µl/ml para *O. vulgare* e evidenciam uma melhor ação antimicrobiana do óleo de *O. vulgare*.

Tabela 1:Concentração Inibitória Mínima dos óleos de *R. officinalis* e *O. vulgare* em a amostras de dermatófitos isoladas de animais e isolado padrão.

Isolados	CIM *Alecrim	CIM **Orégano
	µl ml ⁻¹	µl ml ⁻¹
<i>Microsporum gypseum</i> °	15	0,75
<i>Microsporum gypseum</i>	15	0,75
<i>Microsporum gypseum</i>	15	1,5
<i>Microsporum gypseum</i>	7,5	0,75
<i>Microsporum canis</i>	7,5	0,75
<i>Microsporum canis</i>	3	0,3
<i>Microsporum canis</i>	7,5	1,5
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	3	0,3
<i>Trichophyton verrucosum</i>	30	30

°Isolado padrão ATCC 14687- Fiocruz/Rio de Janeiro/Brazil * *Rosmarinus officinalis* ** *Origanum vulgare*

4.3 Suscetibilidade de *Pythium insidiosum*

Os resultados das CIM do óleo essencial de *O. vulgare* e *R. officinalis* encontram-se especificados na Tabela 2. Os dados obtidos mostram uma variação nos valores do CIMs, entre 3 e 1,5 $\mu\text{l/ml}$ para *R.officinalis* e entre 3 e 0,75 $\mu\text{l/ml}$ para *O. vulgare* e evidenciam também uma melhor ação antimicrobiana do orégano.

Tabela 2:Concentração Inibitória Mínima dos óleos de *R. officinalis* e *O. vulgare* frente a isolados de *P. insidiosum*

Isolados	CIM Alecrim*	CIM Orégano**
	$\mu\text{l ml}^{-1}$	$\mu\text{l ml}^{-1}$
002/09	1,5	0,75
004/09	3	3
008/09	3	0,75
010/09	1,5	0,75
014/10	1,5	0,75
015/10	3	0,3
016/10	1,5	0,3
017/10	1,5	0,3
018/10	3	0,75

Todos os isolados são de *P. insidiosum* proveniente de casos de pitiose em eqüinos.

* *Rosmarinus officinalis* ** *Origanum vulgare*

5 DISCUSSÃO

Ao avaliar os resultados da análise química dos óleos, os compostos observados estão de acordo com a literatura (ARCILA-LOZANO et al 2004; CLEF et al, 2010^a; RODRIGUES, 2002), pois nos óleos estudados estavam presentes em sua maioria monoterpenos ou sesquiterpenos, aos quais pode ser atribuído o efeito antimicrobiano destes óleos, embora muitos outros compostos também possam ter influência sobre os resultados encontrados.

A análise química do óleo essencial de *O. vulgare* demonstrou como componentes majoritários os fenóis como timol, carvacrol, 4-terpineol, γ -terpeno e *p*-cimeno. Segundo alguns autores, pode haver uma grande variação nestes índices de terpenos ficando os mesmos entre 80,2% a 98% na composição total do óleo (BUSSATA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2004; SIMÕES; SPITZER, 2002), concordando com os achados em nosso estudo.

A análise química do *R. officinalis* demonstrou que cânfora, verbenona e 1,8-cineol representaram 70% dos componentes do óleo analisado por cromatografia gasosa. Estes achados estão de acordo com outros estudos que demonstraram a presença destes constituintes no óleo essencial de alecrim em diferentes concentrações (GUILLÉN; CABO; BURILLO, 1996; PORTO; GODOY, 2001; SOLIMAN et al., 1994).

Os resultados de CIM observados no presente estudo demonstraram diferenças de ação antimicrobiana dos óleos avaliados sobre os isolados testados. Estas variações podem ser atribuídas à composição química dos óleos e/ou diferenças intrínsecas dos isolados analisados como descrito anteriormente (GOBBO-NETTO; LOPES, 2007; THOROSKI; BLANK; BILIADERIS, 1989). Outro fator que poderia influenciar os resultados obtidos diz respeito à técnica de microdiluição em caldo utilizada em nosso estudo, uma vez que a mesma não está padronizada para testes com óleos essenciais. Entretanto, essa técnica tem sido

utilizada em outros estudos para avaliar a sensibilidade de isolados fúngicos frente a óleos essenciais, sendo considerada de fácil execução, reprodutível e com resultados similares aos obtidos no presente estudo (CLEFF et al., 2008; CLEFF et al., 2010^{a,b}, FONSECA et al., 2009 POZATTI et al., 2008).

O desenvolvimento de estudos avaliando a ação antimicrobiana de extratos vegetais sobre fungos tem evidenciado um promissor potencial no uso de óleos essenciais de diversas plantas. Considerando-se esse contexto, o presente estudo avaliou a ação de dois óleos essenciais, orégano e alecrim, frente a diferentes espécies de dermatófitos. Os resultados obtidos para o óleo essencial de orégano demonstraram que os CIMs variaram de 30 a 0,3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para *M. gypseum*, *M. canis*, *T. mentagrophytes* e *T. verrucosum*. Estes resultados são similares aos relatados por Adam et al. (1998) ao avaliarem a ação dos óleos de orégano, lavanda, sálvia e menta sobre *T. rubrum* evidenciando CIM de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Embora, no presente estudo, não tenha sido avaliada a ação do orégano sobre essa espécie de dermatófito, ambos os achados sugerem a provável suscetibilidade dos dermatófitos ao óleo essencial de orégano. Entretanto, esses dados diferem dos de Souza et al. (2010) que encontraram CIMs de 80 $\mu\text{L}/\text{mL}$ ao *T. rubrum* e *M. canis* e resistência do *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* ao óleo de orégano. Acredita-se que essas diferenças de atividade do orégano podem ser decorrentes da utilização de óleos de diferentes origens e /ou metodologias de testes *in vitro*, uma vez que no presente estudo evidenciou-se atividade antimicrobiana do óleo essencial de orégano sobre as espécies de dermatófitos testadas. Entretanto, como o número de isolados utilizados foi pequeno, outros estudos deverão ser realizados para comprovar tal achado.

Já os resultados obtidos com o alecrim demonstraram CIMs mais elevados que os encontrados para o orégano, variando de 30 a 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$, o que evidencia a menor atividade antimicrobiana deste óleo sobre os dermatófitos. Entretanto, não há como estabelecer uma relação entre os dois óleos, já que são espécies vegetais diferentes e que apresentam diferenças em sua composição química, o que influencia na sensibilidade dos microrganismos. Anteriormente, Bozin et al. (2007) haviam encontrado CIMs que variaram de 15 μg a 30 μg do óleo essencial de *R. officinalis* frente a *T. mentagrophytes*, *T. tosurans*, *T. rubrum*, *M. canis* e *Epidermophyton floccosum*.

A pitiose é uma doença que vem merecendo destaque na clínica médica e veterinária pela gravidade das lesões e dificuldades de tratamento (SANTURIO et al. 2006). Os métodos terapêuticos disponíveis incluem a cirurgia, a imunoterapia e a quimioterapia (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS; 1996). Embora a cirurgia e a imunoterapia sejam considerados os tratamentos mais eficazes para a pitiose equina (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS; 1996; MENDOZA, NEWTON, 2005), há muitos casos não responsivos a imunoterapia e recidivantes ao tratamento cirúrgico, o que justifica o desenvolvimento de pesquisas que visem a busca de novas e eficazes alternativas terapêuticas. Desta forma, vários estudos *in vitro* e *in vivo* têm sido desenvolvidos para avaliar a eficácia de fármacos antifúngicos, como anfotericina B e derivados imidazólicos, na terapia da pitiose em animias e no homem (ARGENTA et al., 2008; BISSONNETTE et al., 1991; CAVALHEIRO et al., 2009; DYKSTRA et al., 1999; ENGLISH, FROST, 1984; FOIL et al., 1984; GROOTERS, 2003; GONZÁLES et al., 1979; JAEGER et al., 2002; McMULLAN et al., 1977; PUPAIBOOL et al., 2006; RIVIERRE et al., 2005; SHENEP et al., 1998; TRISCOTT et al., 1993). Entretanto, a ausência de ergosterol na membrana citoplasmática dos oomicetos (ALEXOPOULOS; MINS, BLACKUWELL, 1996; GROOTERS, 2003; KWON-CHUNG, 1994) explica os resultados contraditórios e desanimadores desses estudos, visto que o ergosterol é o constituinte alvo de ação da maioria dos antifúngicos disponíveis e mais comumente utilizados na terapêutica clínica (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Na procura por alternativas de tratamento antifúngico, PEREIRA et al (2007) avaliaram a suscetibilidade de *P. insidiosum* *in vitro* e *in vivo* frente ao acetato de caspofungina, um inibidor das β -glucanas da parede celular, observando que o fármaco apresentou apenas limitada atividade fungistática sobre o microorganismo.

A problemática da terapêutica da pitiose, aliada aos resultados de suscetibilidade de *P. insidiosum* aos fármacos antifúngicos estimularam o desenvolvimento do presente estudo. Ao avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de alecrim e orégano sobre isolados de *P. insidiosum* demonstrou-se que os mesmos apresentaram resultados animadores com CIMs que variaram de 3 a 0,75 μ L/mL para orégano e 3 a 1,5 μ L/mL para alecrim, evidenciando-se a melhor atividade antimicrobiana do orégano. Testes *in vitro* com óleos essenciais avaliando a suscetibilidade de *P. insidiosum* não são relatados na literatura, entretanto, alguns estudos têm demonstrado a suscetibilidade de outras espécies fitopatógenas de

Pythium spp a diferentes óleos essenciais, com resultados similares ao observados no presente estudo. Neste contexto, os resultados de Wogiatzi et al. (2009) demonstraram a suscetibilidade de *Pythium* spp ao óleo essencial de *Origanum vulgare*, assim como LEE et al. (2007) que ao avaliarem a atividade de 39 óleos essenciais, entre os quais estavam incluídos orégano e alecrim, observaram que o óleo de orégano foi o que apresentou maior atividade frente a *P. ultimum*. Similaremente, Zambonelli et al. (1996) com óleo de tomilho e Bruni et al. (2003) com óleo de quebra queixo (*Ocotea queixos*), demonstraram atividade antimicrobiana frente a *Pythium ultimum*. Já em outros estudos nos quais foram testados óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* (KUMAR et al., 2007), *Alpivia speciosa* (TAIRA et al., 1994) e *Thymus zygis* (PÉREZ-SÁNCHEZ et al., 2007) também ficou evidenciada a atividade destes sobre espécies de *Pythium* spp avaliadas.

Os resultados obtidos no presente estudo apontam para o potencial uso destes extratos como agentes antifúngicos, evidenciando uma promissora atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*. Todavia, estudos *in vitro* que avaliem um maior número de isolados de *P. insidiosum*, assim como estudos *in vivo* são necessários para viabilizar a utilização dos óleos essenciais de alecrim e orégano na pitiose animal.

6 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *O. vulgare* apresentou em 75% de sua composição os seguintes componentes: p-cimeno, α -terpineno, 4-terpineol, gama-terpineno, timol de e carvacrol. Enquanto o óleo essencial de *R. officinalis* apresentou em 84% de sua composição os seguintes componentes: cânfora, verbenona, 1,8-cineol, mirceno, alfa-terpineol e borneol.

As variações das CIMs do óleo essencial de *O. vulgare* para dermatófitos foi de 30 a 0,3 $\mu\text{l/mL}$ enquanto para *P. insidiosum* foi de 3 a 0,75 $\mu\text{l/mL}$.

As variações das CIMs do óleo essencial de *R. officinalis* para dermatófitos foi de 30 a 3 $\mu\text{l/mL}$ enquanto para *P. insidiosum* foi de 3 a 1,5 $\mu\text{l/mL}$.

REFERÊNCIAS

- ADAM, K., SIVROPOULOU, A., KOKKINI, S., LANARAS, T., ARSENAKIS, M. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi In: *J. Agric. Food Chem.*, v 46, p 1739-1745, 1998
- ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: *Introductory Mycology*. 4.ed. New York: John Wiley, Sons, Chap. 23, p. 683-737, 1996.
- ARANTE, F. C. et al. Micoses, dermatoses e dermatofitose. *Acta. Scientiae Veterinarie*. São Paulo/SP, v. 22, n. 13, p. 13-17, 2003.
- 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-PINÁ, G., LECONA-URIBE, S., MEJIO, E.G., El orégano: propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v.54, n.1, p.100-111, 2004.
- ARGENTA, J.S., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., PEREIRA, D.I.B., CAVALHEIRO, A.S., SPANAMBERG, A., FERREIRO, L., In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 767–769, 2008.
- BALDA, A.C., OTSUKA, M., LARSSON, C.E., Ensaio clínico da griseofulvina e da terbinafina na terapia das dermatofitoses em cães e gatos. In: *Ciência Rural*, Santa Maria, v.37, n.3, p.750-754, 2007.
- BALDA, A.C.; LARSSON, C.E., OTSUKA, M., GAMBALE, W. Estudo retrospectivo de casuística das dermatofitoses em cães e gatos atendidos no Serviço de Dermatologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo. *Acta Scientiae Veterinariae*. 32(2): 133 - 140, 2004.
- BICCHI, C.; BRUNELLI, C.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; GALLI, M.; SIRONI, A.; Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities, In: *Journal Chromatography*, v.1024, p.195-207, 2004.
- BISSONNETTE, K.W. SHARP, N.J.H., DYSTRA, M.H., ROBERTSOM, I.R., DAVIS, A.A., PADHYE, A.A., KAUFMAN, L. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. *Journal of Medical and Veterinary Mycology*. v. 29, p. 39-44, 1991.
- BOSCO, S.M.G. BAGAGLI, E., ARAÚJO JR., J.P, CANDEIAS, J.M.G., FRANCO, M.F., MARQUES, M. E. A., MENDOZA L., CAMARGO, R. P., MARQUES, S. A.. Human pythiosis, Brasil. *Emerging Infectious Diseases*. v. 11, n. 5, p. 715-718, 2005.
- BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SAMOJLIK, I., JOVIN, E., Antimicrobial and Antioxidant Properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) Essential Oils In: *Journal Agricultural. Food Chemistry*, v. 55, p. 7879–7885, 2007.
- BRILHANTE, R.S.N., CAVALCANTE, C.S.P., SOARES-JUNIOR, F.A., CORDEIRO, R.A., SIDRIM, J.J.C., ROCHA, M.F.G. High rate of *Microsporum canis* feline and canine dermatophytoses in Northeast Brazil: Epidemiological and diagnostic features. *Mycopathologia*, v. 156, p. 303–308, 2003.
- BRISOLARA, G. F. Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): principais constituintes e propriedades. 2007 45f. Monografia em Química Universidade Federal de Pelotas.

- BRUNI, R., MEDICI, A., ANDREOTTI, E., FANTIN, C., MUZZOLI, M., DEHESA, M., ROMAGNOLI, C., SACCHETTI, G., Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower cálices. In: Food Chemistry, v. 85, p. 415–421, 2004.
- BUSATTA, C.; MOSSI, A.J.; RODRIGUES, M.R.A.; CANSIAN, R.L.; OLIVEIRA, J.V.. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. Brazilian Journal of Microbiology, v.38, p.610-616, 2007.
- CABAÑES FJ. Dermatofotosis animales. Recientes avances. Revista. Iberoamericana de Micología v. 17: p. S8 – S12, 2000.
- CARDOSO, M. et al. Óleos Essenciais. Lavras: Editora UFLA, 2000. 42 p.
- CARVALHO, J. T.; ALMANÇA, C. C. J. Formulário de Prescrição Fitoterápica. São Paulo: Atheneu, 2003.
- CASTRO, L.O.; CHEMALE, V.M.; Plantas Medicinais, condimentos e aromáticas: descrição e cultivo. Livraria e Editora Agropecuária: Guaíba, 1995, p.9-10
- CAVALHEIRO, A.S. Zanette, A.R., Spader, T.B., Lovato, L., Azevedo, M. I., Botton, S., Alves, S.H., Santurio, J.M.. *In vitro* activity of terbinafine associated to anphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. Veterinary Microbiology. v.137, p. 408-411, 2009.
- CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. Veterinary Clinics of North America: Equine Practice. v. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.
- CLEFF, M. B. FONSECA, A. O. S., SANTIN, R.; NASCENTE, P.; SCHUCH, L. F. D.; RODRIGUES, M. R.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. *Origanum vulgare* x *Rosmarinus officinalis*: avaliação *in vitro* frente à diferentes espécies de *Candida*. In: XVI Congresso de Iniciação Científica e IX ENPOS, 2007, Pelotas, Brasil. Anais...Pelotas : Universidade Federal de Pelotas, UFPel, 2007.
- 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, 115f Tese (Doutorado em Ciências Veterinária). Faculdade de Ciências Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- 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, 2008.
- CLEFF, M.B.; MEINERZ, A. R.; XAVIER, M.; 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, 2010^a.
- 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. In: Arquivos Brasileiros Medicina Veterinária. Zootecnia, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010^b.
- CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. Phytoterapy Research, v. 15, p. 183-205, 2001.
- COSTA, A.C.B.P. 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

- DE COCK, A.W. MENDOZA, L. PADHYE, A. A., AJELLO, L., KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. *Journal of Clinical Microbiology*. v. 25, n. 2, p. 344-349, 1987.
- DIAZ, M. C.; SALAMANCA, L.; PIONTELLI, E. Dermatofitosis: um problema del pasado, um desafio del presente. *Adel Microbiology Enfermidad Infecciosa*, v. 3, p. 212-273, 1984.
- DYKSTRA, M.J.. SHARP, N. J. H, OLIVRY, T., HILLIER, A., MURPHY, K. M., KAUFMAN, L., KUNKLE, G.A., PUCHEU-HASTON, C.. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. *Medical Mycology*. v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.
- ENGLISH, P.B., FROST, A.J. Phycomycosis in a dog. *Australian Veterinary Journal*. v. 61, n. 9, p. 291-292, 1984.
- FISCHER, J.R., PACE, L.W., TURK, J.R., KREEGER, J.M., MILLER, M.A., GOSSER, H.S. Gastrointestinal pythiosis in Missouri dogs: eleven cases. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. v. 6, p. 380-382, 1994
- FOIL, C.S.O. SHORT, B.G.; FADOK, V.A.; KUNKLE, G.A. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium spp*. *Journal of the American Animal Hospital Association*. v. 20, p. 959-966, 1984.
- FOIL, C.S.O. Update on Pythiosis (Oomycosis). *The North American Veterinary Conference*. p. 57-63, 1996.
- FONSECA, A.O.S., WENDISCH, I.; MATTEI, A.S.; SANTIN, R.; OSÓRIO, L.G.; PEREIRA, D.B.; ALVES, G.H.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M. C.A. CLEFF, M.B., Avaliação preliminar do uso de óleo essencial de alecrim Em dermatófitos isolados de animais, In: XVIII Congresso de Iniciação Científica e XI ENPOS, 2009, Pelotas, Brasil. Anais...Pelotas : Universidade Federal de Pelotas, UFPel, 2009.
- GAMBALE, W., CORREA, B., PAULA, C.R., PURCHIO, A., LARSSON, C.E. Ocorrência de fungos em lesões superficiais de cães na cidade de São Paulo, Brasil. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São paulo FMVZ-USP* v. 24: p. 187 – 191. 1987.
- GAMBALE, W., LARSSON, C.E., MORITAMI, M.M. Dermatophytes and other fungi of the haircoat of cats without dermatophytosis in the city of São Paulo, Brazil. *Feline Practice – Fungal Parasitology* p. 21: v. 29-32. 1993
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Plantas medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. *Química Nova* . , v.30, n.2, p.374-381, 2006
- GONZÁLES, H.E., TRHEEBILCOCK, E.P.; AGUIRRE, J.M.; LEÓN, V.J. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. *Revista ICA*. v. XIV, n. 2, p. 115-122, 1979.
- GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*, v.33, p.695-720, 2003.
- GUERRA, M. P., NODARI, R. O. Biodiversidade: Aspectos biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: *Farmacognosia: da planta ao medicamento* . 5 ed. p. 13, Editora a Universidade/UFRGS, Porto Alegre, 2003.
- GUILLÉN, M.D.; CABO, N.; BURILLO, J. Characterization of the essential oils of some cultivated aromatic plants of industrial interest. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 70, n. 3, p. 359-363, Mar. 1996.
- 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.
- HELANDER, I.K.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T. Characterization of the action of selected essential oil components on gram negative

- bacteria . *Journal Agricultural and Food Chemical* ., v. 46, p. 3590-3595, 1998.
- HENTZ, S.M.; SANTIN, N.C.; Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) contra *Salmonella* sp. Evidencia, Joaçaba, v.7, n.2, p.93-100, 2007.
- IMWIDHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. *Postgraduate Medical Journal*. v. 70, p. 558-560, 1994.
- JAEGER, G.H.; ROTSTEIN, D.S.; LAW, J.M. Prostatic pythiosis in a dog. *Journal Veterinary Internal Medicine*. v. 16, p. 598-602, 2002.
- JOLLY, A. B.; *Botânica: Introdução à Taxonomia Vegetal*; Nacional: São Paulo, 1995, p. 582-586.
- KOKKINI, S.; KAROUSOU, R.; VOKOU, D. Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Bioch System Ecol.*, v. 22, p. 517-528, 1994.
- KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clinical Infectious Disease*. v. 43, p. 569-576, 2006.
- KUMAR, R., MISHRA, A.K., DUBEY, N.K., TRIPATHI, Y.B. Evaluation of *Chenopodium ambrosioides* oil as a potential source of antifungal, antiaflatoxic and antioxidant activity. In: *International Journal of Food Microbiology*, v.115, p.159-164, 2007.
- KWON-CHUNG, K.J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. *Clinical Infections Diseases*. v. 19, suppl. (1), p. 1-7, 1994.
- LACAZ, C. S. et al. *Tratado de Micologia Médica Lacaz*. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 1104p, 2002.
- LAMBERT, R.J.W., SKANDAMIS, P.N, COOTE, P.J., NYCHAS, G.-J.E. A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. IN: *Journal Applied of Microbiology*, v.91, p.453-462, 2001.
- LARSSON, C.E., FERNANDES, W.R., LARSSON, M.H.M.A., HAGIWARA M.K. Ocorrência de dermatomicoses em cães e gatos de São Paulo. Aspectos Clínicos e terapêuticos. XXXV Conferência Anual da Sociedade Paulista de Medicina. Veterinária, São Paulo- Brasil, 1980.
- LEAL, A.T. LEAL, A.B.M., FLORES, E.F. SANTURIO, J.M., Pitiose – Revisão bibliográfica. *Ciência Rural*. v. 31, n. 4, p. 735-743, 2001.
- LEE, S.O., CHOI, G.J.C., JANG, K.S., LIM, H.K., CHO, K.Y., KIM, J.C., Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. In: *The Plant Pathology Journal*, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. *Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002. 512 p.
- MACHADO, M.L.S., APPELT, C. E., FERREIRA, L. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. In: *Acta Scientiae Veterinariae*, v.32, p.225-232, 2004.
- 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*. 67: 187-195, 2001.
- MATTOS, J. M. D.; MATTOS, M. E. O.; *Farmacognosia: Curso Teórico-Prático*; UFC: Fortaleza, p. 161 – 169, 1986.
- MAY, A.; SUGUINO, E.; MARTINS, A.N.; BARATA, L.E.S.; PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis L.*) em função da altura e intervalo entre cortes. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

- MCMULLAN, W.C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. v. 170, p. 1293-1297, 1977.
- MEDEIROS, F.; CREPALDI, N.; TOGNOLI, L.; PEREIRA, R.E.P. Dermatofitos – Revisão de literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária* v.12, 2009.
- MEINERZ, A.R.N.; ROSA, C.S. Dermatofiteo, In: *Micologia Veterinária*, v.1, p. 85-96, 2009.
- MEIRELES, M.C.A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. *Mycoses*. v. 36, p. 139-142, 1993.
- MENDOZA, L., ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. *Mycopathologia*. v. 94, p. 123-129, 1986.
- MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Médicale*. v. 6, n. 4, p. 151-164, 1996.
- MILLER, R.I. , CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. *Australian Veterinary Journal*. v. 58, p. 221-226, 1982
- MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. *Australian Veterinary Journal*. v. 57, p. 377-382, 1981.
- MOORE-LANDECKER, J. Zoospore Fungi. *Fundamentals of the Fungi*. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, 1996. Cap. 3, p. 33-79.
- PEREIRA, D.I.B., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., ARGENTA, J.S., POTTER, L., SPANAMBERG, A., FERREIRO, L.; Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J. Antimicrob. Chemother.* 60, 1168–1171. 2007.
- PERES, N.T.A.; MARANHÃO, F.C.A.; ROSSI, F.; ROSSI, N.M.M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. *Anais Brasileiros de Dermatologia*. v.85, n.5, 657-667, 2010.
- PÉREZ – SÁNCHEZ, R.; INFANTE, F.; GÁLVEZ, C.; UBERA, J. L.; Fungitoxic activity against phytopathogenic fungi and the chemical composition of *Thymus zygis* essential oils In: *Food Science and Technology International*, v. 13, p. 341-347 , 2007.
- PINHEIRO, A.Q., MOREIRA, L.B., SIDRIM, J.J.C., Dermatofitose no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. *Rev. da Soc. Bras. D Medicina Tropical*. v.30, p.287-294, 1997.
- PINTO, A. C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos Naturais Atualidades, Desafios e Perspectivas. *Química Nova*, v.25, supl.1, p.45-61, 2002.
- PORTO, A ; GODOY, R.L.O.; Alecrim (*Rosmarinus officinalis*): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. In: *B. Ceppa*, v.19; p. 193-210, Curitiba 2001.
- POZZATTI, P., SCHEID, L.A., SPADER, T.B., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H. *In vitro* activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Canadian Journal of Microbiology* vol. 54, p950, 2008.
- PUPAIBOOL, J. et al. Human pythiosis. *Emerging Infectious Disease*. v. 12, n. 3, p. 517-518, 2006.
- RIBEIRO, E.M., FERRAZIN, A., SANTOS, A.O., UEDA-NAKAMURA, T. DIAS FILHO, B.P., NAKAMURA, C.V., Atividade Antifúngica do Óleo Essencial Obtido de *Cymbopogon citratus* e do Componente Majoritário Citral. In: *Anais do XVI EAIC*, 2007.

- RIVIERRE, C.; LAPRIE, C.; GUIARD-MARIGNY, O.; BERGEAUD, P.; BERTHELEMY, M.; GUILLOT, J. Pythiosis in Africa. *Emerging Infectious Disease*. v. 11, n. 3, p. 479-481, 2005.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E.; *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*; Premier: São Paulo, 1997, 91-109.
- RODRIGUES, M. R. A.; Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano. 143f. Tese de Doutorado em Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2002.
- RODRIGUES, M.R.A., KRAUSE, L.C., CARAMÃO, E.B., SANTOS, J.G., DARIVA, C.; OLIVEIRA, J.V. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. *J. Agric. Food Chem.*, v.52, p.3042–3047, 2004
- SÁ, R.C.S.; LEITE, M.N.; OLIVEIRA, L.E.G.; TOLEDO, M.M.; GREGGIO, T.C.; GUERRA, M.O.; Preliminary assessment of *Rosmarinus officinalis* toxicity on male Wistar rats' organs and reproductive system. In: *Rev. Bras. de Farmacognosia*. V. 16(3); p.324-332, 2006.
- SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against Gram Positive bacteria. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, n.4, p.421-424, 2009.
- SAITO, M. L.; SCRAMIN, S.; *Plantas Aromáticas e Seu Uso na Agricultura*; Jaguariúma: Embrapa Meio Ambiente, 2000.
- SANTOS, J.I., COELHO, M.P.P., NAPPI, B.P. Dermatophytosis' laboratorial diagnosis. *Revista Brasileira Análises. Clínicas.*, v. 34, p. 3-6, 2002.
- SANTOS, M.N. , LONDERO, A.T. Zigomicose subcutânea em cavalos, *Pesquisas Agropecuárias Brasileiras-Série Veterinária*. v. 9, p. 7-8, 1974.
- SANTURIO, J.M, MONTEIRO, A.B.; LEAL, A.T.; KOMMER, G.D.; SOUSA, R.S.; CATTO, J.B. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. *Mycopathologia*. v. 141, p 123-125, 1998.
- SANTURIO, J.M., ALVES, S.H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA, J.S. Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinarie*. v. 34, n. 1, p. 1-14, 2006.
- SANTURIO, J.M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAIS, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, A.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.
- SATHAPATAYAVONGS, B., LEELACHAIKUL, P.; PRACHAKTAM, R.; ATICHARTAKARN, V.; SRIPHONJANART, S.; TRAIRATVORAKUL, P.; JIRASIRITHAM, S.; NONTASUT, S.; EURVILAICHIT, C.; FLEGEL, T. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. *The Journal of Infectious Diseases*. v. 159, n. 2, p. 274-280, 1989.
- SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; GARG, A.K. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffe* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. *European Journal of Epidemiology*. v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.
- SENA, K.X.F.R.; ANDRADE, M.S.A.S.; LIMA, R.C.; SANTOS, E.R. Atividades biológicas de *Rosmarinus officinalis* L. (*R. latifolius* Mill). *Boletim da Sociedade Broteriana*, v. 66, p. 97-109, 1993.
- SHENEP, J.L.; ENGLISH, B.K.; KAUFMAN, L.; PEARSON, T.A.; THOMPSON, J.W.; KAUFMAN, R.A., FRISCH, G.; RINALDI, M.G., Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clinical Infectious Disease*. v. 27, n. 6, p. 1388-1393, 1998.

- SIDRIM, J. C.; MOREIRA, J. L. B. Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 287p., 1999.
- SILVA, M.S.A. 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.; SPITZER, V.; *Óleos Essenciais, Em Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*; 4ª ed., Universidade/UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2002, p. 397–420.
- SIMPANYA MF, BAXTER M. Isolation of fungi from pelage of cats and dogs using the hairbrush technique. Mycop v.134: p.129-133, 1996.
- SOLIMAN, F.M.; EL-KASHORY, E.A.; FATHY, M.M.; GONAIID, M.H. Analysis and biological activity of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* from Egypt. Flavour and Fragrance Journal, v. 9, n. 1, p. 29-33, Jan./Feb.1994.
- SOUZA, A. E. F. et al. Dermatofitose associadas a fungos do gênero *Microsporum*. Clínica Veterinária, São Paulo/SP, v. 13, n. 5, p. 24-26, 2002.
- SOUZA, E.L. et al. 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., 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 In: Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences v. 46, n. 3, p. 499-508, 2010
- TAIRA, S., TAWATA, S., KOBAMOTO, N., TOYAMA, S., YASUDA, M.; Synthesis and fungicidal activity of new 1,3,2 – Oxazaphospholidine 2 – sulfides. In: J. Pesticide Sci, v. 19, p 299-304, 1994.
- TANI, K., ADACHI, M., NAKAMURA, Y., KANO, R.,MAKIMURA, K.,HASEGAWA, A., KANDA, N.,WATANABE, S. The effect of dermatophytes on cytokine production by human keratincyte. Arch. Dermatol. Res., v.299, p.381-387,2007.
- THOROSKI, J.; BLANK, G.; BILIADERIS, C.; Eugenol induced inhibition of extracelular enzyme production by *Bacillus cereus*. In: Journal Food Products, v.52, p. 399-403, 1989.
- TIGRINE-KORDJANI, N.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F.; Microware “dry” distillation as an useful tool extration of edible essencial oil. In: International Journal Aromatherapy,v. 16,p. 141-147, 2006.
- TOSTES, R.A.;GIUFFRIDA, R. Pseudomicetoma dermatofítico em felino. IN: Ciência Rural, Santa Maria, v.33, p.363-365,2003.
- TRISCOTT, J.A.; WEEDON, D.; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. Journal of Cutaneous Pathology. v. 20, n. 3, p. 267-271, 1993.
- TSINAS, A. C. The art of orégano. Grain Feed , Milling Technology, p. 25-26, 1999.
- UPNMOOR, I.; *Características e Utilização das Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares*; vol. 1, Agropecuária: Guaíba, 2003, p. 10-12.
- VAGI, E.; RAPAVI, E.; HADOLIN, M.; VÁSA’RHELINÉ PERÉDI, K.; BALÁSZ, A.; BLÁZOVICS, A.; SIMÁNDI, B. Phenolic and tripterpenoid antioxidant from *Origanum majorana* L. herb and extracts obtained with different solvents. Journal of Agricultural and Food Chemistry , v. 53, p. 17-21, 2005.
- 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.
- WOGIATI, E., GOUGOULIAS,A., PAPACHATZIS, A., VAGELAS, I., CHOULIARAS,N., Chemical composition and antimicrobial effects of grek *Origanum* species essential oil. In: Biotechnol. & Biotechnol., v. 23, p.1322-1324, 2009.

YUNES, R.A.; CALIXTYO, J.B. Plantas Mediciniais sob a ótica da moderna química medicinal. Agos: Chapecó, 550p, 2001.

ZAMBONELLI, A., D'AULERIO, A.Z., BIANCHI, A., ALBASINI, A., Effects of Essential Oils on Phytopathogenic Fungi *In Vitro*. In: Journal. Phytopathology, v.144, p.491-494, 1996.