

## CANDIDÍASE EXPERIMENTAL VAGINAL: AVALIAÇÃO DO *ORIGANUM VULGARE* NO TRATAMENTO

WENDISCH, I.<sup>1\*</sup>; MARTINS, A.A.<sup>2</sup>; XAVIER, M.O.<sup>3</sup>; SCHUCH, L.F.<sup>3</sup>;  
CABANA, A.L.<sup>1</sup>.; SALLIS, S.E.<sup>4</sup>; RODRIGUES, M.R.<sup>5</sup>.; MELLO, J.R.B.<sup>2</sup>.,  
MEIRELES, M.C.<sup>3</sup>.; CLEFF, M.B.<sup>3</sup>

### INTRODUÇÃO

As leveduras do gênero *Candida* são cosmopolitas e fazem parte da microbiota do homem e animais, colonizando mucosas do trato gastrointestinal, vaginal, anal e pele. *Candida* apresenta-se como um microrganismo pleomórfico, estando na forma de levedura e na forma de micélio ou hifa, exibindo a característica de pseudomicélio em certos ambientes nutricionais. Essas leveduras tornam-se patogênicas quando fatores locais e fatores ligados ao hospedeiro favorecem o aumento do número de células, levando a ocorrência de diferentes quadros clínicos (Lacaz et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2003; Cleff et al., 2007).

A colonização da mucosa vaginal por *Candida* spp pode levar a candidíase vulvovaginal (CVV) que representa um problema universal, afetando milhões de mulheres em todo o mundo (Sobel 1995; Ziarrustra, 2002). A CVV é atualmente um relevante problema de saúde, e profissionais atuantes na área médica têm a necessidade de conhecer aspectos atuais sobre a infecção e novas opções de tratamento, aumentando assim a necessidade de pesquisas de novas substâncias com atividade antifúngica. (Val & Almeida Jr., 2001).

A pesquisa de princípios ativos oriundos das plantas tem despertado interesse, em função da grande diversidade de compostos com possível ação antimicrobiana, já que algumas espécies de *Candida* já desenvolveram resistência aos antifúngicos disponíveis (Lacaz et al., 2002; Silva et AL.; 2002)

O tratamento convencional se dá com uso de antifúngicos do grupo dos poliênicos, como Nistatina e fármacos da classe dos azóis (Farias & Giufrida, 2002). Entretanto testes *in vitro* tem demonstrado resultados promissores com o uso de óleos essenciais derivados de plantas aromáticas frente a fungos de interesse veterinário (Chami et al., 2004; Giordani et al., 2004), assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do orégano (*Origanum vulgare*) no tratamento da candidíase vaginal experimental.

---

<sup>1\*</sup>Bolsista de Iniciação Científica – CNPq; Laboratório de Doenças Infecciosas - Setor Micologia, UFPel, iarawendisch@hotmail.com;

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, UFRGS;

<sup>3</sup> Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel;

<sup>4</sup> Departamento de Patologia Animal, Faculdade Veterinária, UFPel;

<sup>5</sup> Departamento de Química Orgânica, UFPel.

## MATERIAL E MÉTODOS

A amostra de orégano utilizada no estudo foi adquirida em distribuidor comercial (Torrenueva Vascos Ltda., I.M.M.Reg.S.B.Nº.1082/08, Indústria Uruguaya). Cerca de 40g de folhas secas de orégano foram submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira, para obtenção do óleo. O óleo essencial obtido foi analisado por GC/FID, sendo caracterizado em função dos principais constituintes químicos. Para tal 1µL de soluções de concentrações variadas de padrões foram injetadas no cromatógrafo e, comparados com o tempo de retenção de padrões referentes aos principais compostos presentes em amostras de orégano.

Para a realização do estudo *in vivo* foram utilizados 48 ratos norvergicus (*Rattus rattus*), albinos linhagem Wistar, fêmeas com peso médio de 240g. Os animais foram alojados no Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (UFPEl), sendo mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro recebendo dieta de acordo com peso corporal água *ad libitum* durante o período experimental.

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

A técnica de reprodução experimental da candidíase vaginal foi realizada conforme Martinez e colaboradores (2001). Para o desenvolvimento da Candidíase experimental os animais foram ovariectomizados, tratados antes da inoculação e semanalmente com valerato de estradiol, via subcutânea e foram imunossuprimidos com 2 mg/L de dexametasona (Fortecortin, Laboratório Merk) adicionado na água de beber.

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

Antes da inoculação e antes de começar o tratamento, foram coletadas amostras da cavidade vaginal dos animais para confirmação da ausência e/ou presença de leveduras do gênero *Candida*.

Após o período de adaptação, todos os animais foram inoculados intravaginalmente, utilizando seringa graduada de 1 mL com 0,2 mL de suspensão do inóculo.

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais:

**T1 (n=12):** Tratados com 0,2 mL de óleo a 1,5% em suspensão contendo 0,5% de Ágar; **T2 (n=12):** Tratados com 0,2 mL de óleo a 3% em 0,8% de Agar; **T3 (n=12):** Tratados com 0,2 mL de suspensão de nistatina (1000UI/dia); **T4 (n=12):** Tratados com 0,2 mL de suspensão de ágar a 0,8%.

No decorrer do experimento, foi realizado o acompanhamento clínico dos animais experimentais, sendo analisados quanto ao estado geral, de acordo com os seguintes parâmetros: Apatia, desidratação, lesão cutânea, perda pêlos, pontos na mucosa, vermelhidão e pêlos arrepiados, além de ocorrência de mortes e realização de pesagens semanais de todas as ratas.

Durante e ao final do experimento foram realizadas necropsias, sendo colhido o trato reprodutivo e órgãos internos como estômago, intestino, baço,

rins e fígado, quando existiam lesões compatíveis com candidíase disseminada, sendo encaminhadas para análise micológica e histopatológica. Posteriormente foram cultivados Por plate em placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol e mantidos a 37°C para contagem e caracterização macro e micromorfológica das leveduras do gênero *Candida*.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial utilizado para o tratamento foi extraído previamente conforme metodologia descrita (Rodrigues et al., 2004) e apresentava a seguinte composição química: alfa- felandreno, alfa-terpineno, limoneno, linalol, gama-terpineno, 4terpineol, alfa-terpineol, timol, carvacrol e beta-cariofileno. Estes resultados concordam com os dados da literatura, onde tem sido descrito que o óleo essencial de *Origanum vulgare* apresenta em torno de 34 compostos ativos, sendo que os fenóis como carvacrol, timol, gama terpeno e p-cimeno podem alcançar entre 80,2% a 98% da composição total do óleo. As altas concentrações destes compostos e sua relação são de grande importância para a eficácia do produto, estudos demonstram que a eficácia de compostos isolados, como timol e carvacrol, não alcançam a mesma eficiência do óleo essencial (Simões et al., 2003; Rodrigues et al., 2004).

A concentração inibitória mínima (MIC) e concentração fungicida mínima (MFC) do óleo essencial frente ao isolado utilizado para inoculação dos animais experimentais, foi previamente determinada pelo método de microdiluição em caldo (NCCLS M27-A2) apresentando valores médios de MIC igual a 1,2 µL mL<sup>-1</sup> e MFC igual a 2,5 µL mL<sup>-1</sup>.

A avaliação da eficácia dos tratamentos foi determinada através de parâmetros clínicos, hematológicos, avaliação microbiológica e hitopatológica.

Com relação aos parâmetros clínicos avaliados durante o período experimental, não foram observadas quaisquer alterações estatisticamente significativas nos animais pertencentes aos grupos estudados, sendo os resultados apresentados na Tabela 1. Porém observou-se que os animais do Grupo T4 (Controle negativo) apresentaram maiores alterações dos parâmetros avaliados quando comparados aos outros grupos (T1, T2, T3) e que o Grupo T3 (Controle positivo) foi aquele que apresentou o menor percentual de alterações nestes parâmetros.

Tabela 1: Percentual de alterações clínicas observadas nos animais experimentais com candidíase vaginal durante o período de 30 dias do estudo.

Parâmetros Avaliados	T1			T2			T3			T4		
	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 1	Sem 2	Sem 3	Sem 1	Sem 2	Sem 3
Apatia	13,3	0	0	15	10	0	10	10	10	30	0	0
Desidratação	6,6	20	20	13,3	16	25	20	10	10	30	20	20
Lesão Cutânea	13,3	0	0	13,3	0	0	10	0	0	20	0	0
Perda Pêlos	20	0	0	20	6,6	6,6	10	0	0	30	20	20
Ptos.Mucosa	13,3	13,3	13,3	33	6,6	6,6	0	0	0	30	20	10
Eritema	20	20	20	26,6	6,6	6,6	10	5	0	50	40	40
Pêlos Arrep	33,3	33,3	33,3	40	20	20	30	20	20	40	40	40

\*Avaliação realizada a cada semana, totalizando três observações, por animal em cada um dos grupos experimentais; **T1**: *O. vulgare* intravaginal 1,5%; **T2**: *O. vulgare* intravaginal 3%; **T3**: Nistatina; **T4**: Suspensão de Ágar 0,8%.

Com relação aos pesos dos animais, houve diferenças significativas quando comparado o peso dos animais no final e no início do experimento conforme apresentado na Tabela 2. Essa diferença pode ser melhor explicada pelo déficit de peso inicial do grupo T2. Conforme demonstrado na tabela, esse grupo, apesar da aleatorização para alocação dos animais em cada tratamento, apresentou peso inicial menor do que os demais. Observou-se uma perda de peso dos animais pertencentes a todos os grupos na segunda semana do experimento, o que pode ser explicado pelo estresse sofrido pelos animais decorrente da mudança de hábitos e pela manipulação diária destes para administração dos fármacos.

Tabela 2: Média Aritmética da massa corporal dos animais experimentais pertencentes aos Grupos T1, T2, T3 e T4, aferidas semanalmente pelo período de quatro semanas.

Grupos Experimentais	Massa Inicial (g)	2ªPesagem	3ªPesagem	4ªPesagem	Massa Final (g)
T1	266,6±17 <sup>a</sup>	261,2±23	268,2±23	268,6±22	269,4±20 <sup>ab</sup>
T2	246,8±19 <sup>b</sup>	247,4±10,8	252,5±17	253±20	256±16 <sup>b</sup>
T3	270±20 <sup>a</sup>	265,7±19,8	269,5±18	272,2±15	279,8±5,7 <sup>a</sup>
T4	277,5±14 <sup>a</sup>	257,2±10,2	260,5±10	263±12	263,8±6,8 <sup>ab</sup>

T1: *O. vulgare* intravaginal 1,5%; T2: *O. vulgare* intravaginal 3%; T3: Nistatina; T4: Suspensão de Ágar 0,8%; <sup>a</sup>, <sup>b</sup>, <sup>ab</sup> diferença estatística de 0,05%.

Os resultados de hemograma dos animais experimentais pertencentes aos grupos T1, T2 e T3 apresentaram-se dentro dos parâmetros fisiológicos esperados para a espécie estudada, sendo que a contagem dos tipos celulares, nos diferentes tratamentos não diferiu estatisticamente entre si ( $p > 0,05$ ), conforme descrito na Tabela 3. Porém no tratamento quatro (T4), os animais apresentaram hematócrito, hemoglobina e número de hemácias abaixo do limite fisiológico caracterizando um quadro de anemia, as PPT estavam aumentadas em quatro animais e ocorreu provavelmente devido a desidratação.

No leucograma, em todos os grupos observou-se uma diminuição dos leucócitos totais devido a uma linfopenia, o que pode ser explicado pela administração de corticosteróides em todos animais experimentais. Conforme a literatura consultada os valores de linfócitos para ratos wistar situam-se entre  $5,6-8,3 \times 10^6$  uL, enquanto que para os leucócitos totais os valores ficam entre  $6-10 \times 10^6$  uL (HARKNESS & WAGNER, 1995). No grupo T4, cinco ratas demonstraram marcada leucopenia por linfopenia, sendo que quatro animais tinham contagem de leucócitos totais entre  $3000/\text{mm}^3$  e  $4100/\text{mm}^3$  e um apresentou  $1900/\text{mm}^3$  de leucócitos totais. Os resultados observados no grupo T4, podem ser decorrentes da manutenção da infecção vaginal por *Candida albicans* nestes animais o que poderia estar, causando alterações sistêmicas que se refletiram nos resultados do hemograma.

Tabela 3: Valores médios  $\pm$  desvio padrão referentes ao hemograma dos animais experimentais tratados via intravaginal e respectivos controles, aferidas ao final do experimento.

<b>Parâmetros avaliados</b>	<b>T1</b>	<b>T2</b>	<b>T3</b>	<b>T4</b>
Eosinófilos (mm <sup>3</sup> )	97,3 $\pm$ 36,45	35,8 $\pm$ 33	17 $\pm$ 38,7	0
Monócitos (mm <sup>3</sup> )	0	10,1 $\pm$ 5,26	0	0
Linfócitos (mm <sup>3</sup> )	2781 $\pm$ 188,7	3093,6 $\pm$ 151	3118 $\pm$ 624	2028 $\pm$ 207,6
Bastonetes (mm <sup>3</sup> )	0	0	0	0
Segmentados (mm <sup>3</sup> )	1361 $\pm$ 299	885,1 $\pm$ 270,8	1473 $\pm$ 317	1572 $\pm$ 212
Leucócitos Totais (mm <sup>3</sup> )	4239 $\pm$ 478	4024,6 $\pm$ 215	4598 $\pm$ 468	3600 $\pm$ 110
ERITRÓCITOS (x 10 $\mu$ L)	6,8 $\pm$ 1,98	7,2 $\pm$ 0,4	7,42 $\pm$ 0,92	7,23 $\pm$ 0,55
HEMOGLOBINA (g/dL)	11,5 $\pm$ 0,43	11,09 $\pm$ 0,39	11 $\pm$ 0,45	9,75 $\pm$ 3,45
HEMATÓCRITO (%)	37,3 $\pm$ 1,35	36,4 $\pm$ 1,22	35,7 $\pm$ 1,43	32 $\pm$ 10,33
PPT (%)	7,33 $\pm$ 0,35	6,6 $\pm$ 0,32	6,8 $\pm$ 0,37	9 $\pm$ 0,65

**T1:** *O. vulgare* intravaginal 1,5%; **T2:** *O. vulgare* intravaginal 3%; **T3:** Nistatina; **T4:** Suspensão de Ágar 0,8%.

Com relação às alterações macroscópicas do trato reprodutivo observadas durante a necropsia, estas estiveram presentes de forma isolada em alguns animais do grupo T4, apresentado-se como eritema, pontos brancos e ulcerações da mucosa. Á partir da mucosa vaginal foi feito o retroisolamento do agente demonstrando permanência da levedura nos grupos tratados T1 (3,1 log UFC) e T2 (1,2 log UFC), porém o número de unidades formadoras de colônias (UFC) esteve reduzido quando comparado ao T4 (5,2 log UFC), demonstrando que os tratamentos levaram há diminuição do agente porém não eliminando-o totalmente no período de 30 dias, mas ressalta-se que o grupo T2 aproximou-se dos resultados observados no grupo T3 (0,5 log UFC), onde a contagem da levedura após 30 dias de tratamento ficou praticamente zerada. No estudo a nistatina (T3) demonstrou ser efetiva no tratamento da candidíase vaginal, o que confirma observações prévias, sendo o fármaco indicado para terapêutica da infecção (Farias & Giufrida 2002).

Apesar dos resultados preliminares demonstrarem um bom desempenho do Óleo essencial a 3%, estes não são conclusivos, sendo necessário avaliar todos os dados conjuntamente, especialmente os resultados da análise histopatológica. Á partir deste exame poderemos obter informações que irão contribuir para uma resposta conclusiva a respeito da eficácia dos tratamentos, entretanto a análise encontra-se em fase de processamento.

## CONCLUSÕES

Conforme os resultados obtidos o óleo essencial do *O. vulgare* a 3% parece ser promissor para o tratamento da Candidíase vulvovaginal, porém são necessários estudos complementares para confirmar esta atividade.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **The Braz. J. Infec. Dis.**, 8(3): 217-226, 2004.
- FARIAS, M.R.; GIUFFRIDA, R. Antifúngicos. In: ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. Rocca: São Paulo, p.59-70, 2002.
- CLEFF, M.B.; SILVA, G.M.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.M.; MARTINS, A.A.; FONSECA, A.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO J.R.B. Infecção cutânea em cão por *Candida albicans*. **Rev. Vet. Zoot.**, 2:14, 2007.
- GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAI, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of Various Essential Oils against *Candida albicans*. Potentiation of Antifungal Action of Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. **Phytot. Res.**, 18:990-995, 2004.
- LACAZ, C.S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9.ed., São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p.
- Rodrigues, M. R. A., Krause, L. C., Caramão, E. B., Santos, J. G., Dariva, C. and Oliveira, J. V. (2004) Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare*. **J Agric Food Chem.**, 52, 3042–3047.
- HARKNESS, J. E.; WAGNER, J. E. **The biology and medicine of rabbits and rodents**. Baltimore:Williams and Williams, 1995. 372 p.
- SILVA, V.; DIAZ, M.C.J.; FEBRÉ, N.Y. Red de diagnostico em micologia medica. Vigilância da la resistência de leveduras a antifúngicos. **Rev. Chil. Infectol.** v.19, n.2, 2002.
- Sobel JD. Epidemiology and pathogenesis of recurrent vulvovaginal candidiasis. **Am J Obstet Gynecol.**; 1985; 157 (7): 924-934.
- Val, I.C.C.; Almeida F<sup>o</sup>., G.L. Abordagem Atual da Candidíase Vulvaginál. **DST- J Bras Doenças Sex Transm** ., 2001, 13 (4): p.3-5.
- ZIARRUSTA, G.B. Vulvovaginitis candidásica. **Revista Iberoamericana de micologia**, v.19, p. 22-24, 2002.