

AVALIAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DO *O. VULGARE* NO TRATAMENTO DA CANDIDÍASE EXPERIMENTAL SISTÊMICA

WENDISCH, I.^{1*}; FARIA, R.O.²; SANTIN, R.³; MADRID, I.³; OSORIO, L.¹.; SILVA, F.V.¹; RODRIGUES, M.R.A.⁵; MELLO, J.R.B.²; MEIRELES, M.C.⁴; CLEFF, M.B.⁴

INTRODUÇÃO

A candidíase ocorre devido à multiplicação e invasão de *Candida* spp. nos tecidos, podendo causar lesões superficiais em pele e mucosas, assim como disseminação para diferentes órgãos como rins, pulmão, coração, articulações, ossos e sistema nervoso central (Lacaz et al., 2002). As formas clínicas mais severas da enfermidade têm sido associadas com pacientes imunocomprometidos, neutropênicos e transplantados (Sant'ana et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2003).

Em clínica médica humana *Candida* spp vem sendo amplamente reconhecida como o patógeno oportunista de maior ocorrência, e apontada como principal agente de micoses em imunodeprimidos em todo o mundo (Lacaz et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2003). A passagem da levedura de comensal é importante agente de infecções, ocorre comumente em ambiente hospitalar, como resultado do próprio progresso da medicina (Lacaz et al., 2002; Colombo & Guimarães, 2003).

Em medicina veterinária a multiplicação das leveduras é facilitada por alguns fatores como: produção excessiva de cerume no caso de otites, alterações do pH, após terapia antibiótica ou com glicocorticóides, com fármacos indutores de neutropenia, deficiência nutricional, doenças metabólicas, endocrinopatias, confinamento, assim como deficiência na resposta imune mediada por células, podem ser importantes no desencadeamento da infecção, sendo crescentes os casos citados na literatura (Lacaz et al., 2002; Moretti et al., 2006; Cleff et al., 2007).

O fluconazol é um dos fármacos mais utilizado para tratamento das infecções sistêmicas por *Candida*, no entanto, seu uso é restrito nos casos de infecções por *C. Krusei*, *C. glabrata*, devido a resistência frente ao antifúngico (Santos Jr. et al., 2005; Castro et al., 2006).

Estudos têm avaliado a atividade antifúngica do óleo essencial do *Origanum vulgare*, demonstrando inibição de *Candida* spp em testes *in vitro* e *in vivo* (Lambert et al., 2001; Chami et al., 2004; Giordani et al., 2004), assim como forte ação frente a outros fungos (Daferera et al, 2000; Lambert et al, 2001).

As infecções sistêmicas são relatadas de forma isolada em animais, porém a possibilidade de disseminação de *Candida* spp. para diversos tecidos é uma realidade cada vez mais próxima da medicina veterinária, e o profissional tem que estar preparado para o reconhecimento e administração da terapia adequada. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o óleo essencial do *O. vulgare* no tratamento da candidíase experimental sistêmica.

^{1*}Bolsista de Iniciação Científica – CNPq; Laboratório de Doenças Infecciosas - Setor Micologia, UFPel, jarawendisch@hotmail.com.

² Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, UFRGS;

³ Programa de Pós-graduação em Veterinária, UFPel;

⁴ Departamento de Veterinária Preventiva, UFPel;

⁵ 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). O óleo essencial obtido foi analisado por GC/FID, sendo caracterizado em função dos principais constituintes químicos.

No estudo, foram utilizados 48 ratos norvergicus (*Rattus rattus*), albinos linhagem Wistar, com oito semanas de idade, machos com peso médio de 300g. Todos os animais foram adaptados ao manuseio e os procedimentos respeitaram os princípios da ética em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram distribuídos em quatro grupos experimentais:

T1 (n=12): Tratados com 0,5 mL de emulsão de óleo a 1,5% com 0,001% de Tween 80; **T2 (n=12):** Tratados com 0,5 mL de emulsão de óleo a 3% em solução contendo 0,001% de Tween 80; **T3 (n=12):** Tratados com 0,5 mL de solução de Fluconazol (10mk/Kg); **T4 (n=12):** Tratados com veículo contendo 0,001% Tween 80.

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 10⁶ células de *C. albicans*/mL. Foi inoculado 0,1 mL pela veia lateral da cauda em todos os animais experimentais, sendo todos anestesiados previamente.

A candidíase experimental sistêmica foi desenvolvida de acordo com Yamaguchi (1987). Uma semana antes da inoculação, e durante o experimento, os animais receberam acetato de hidrocortizona 100 mg/Kg, a cada 7 dias via subcutânea e adicionado 0,5mg/mL hidrocloreto de tetraciclina na água de beber dos animais, para controle das infecções bacterianas secundárias.

A administração dos fármacos aos animais nas doses preestabelecidas, foi realizada com sonda orogástrica, após 24hs do inóculo. Durante o período experimental, os animais foram avaliados duas vezes por semana, a fim de observar alterações físicas e/ou comportamentais, sendo essas descritas em relatórios semanais. Foi observado: estado geral de cada animal, modificação da deambulação, piloereção, alterações de comportamento, como agressividade, consciência e disposição, assim como feitas avaliações do sistema locomotor como presença/ausência de incoordenação e perda de equilíbrio e ocorrência mortes.

No final de 30 dias, os animais foram sacrificados através de anestesia profunda e necropsiados. Foram feitas análises macroscópicas da mucosa oral e de órgãos internos como estômago, intestino, baço, rins, fígado, pulmão, coração e cérebro, sendo todos os órgãos semeados em ágar Sabouraud Dextrose com cloranfenicol e acondicionados à 35°C por 24-hs para obtenção do retroisolamento do agente. Os mesmos procedimentos descritos foram realizados com os animais que morreram durante o período experimental. Fragmentos de todos os órgãos foram coletados, conservados em formol a 10% e enviados para análise histopatológica.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para análise das frequências foi utilizado o programa Epi Info 6.0, e o teste de qui-quadrado, segundo Mantel-Henzel, com grau de significância de 95%. A análise

comparativa de um escore clínico, foi realizado através do método para dados não-paramétricos de Kruskal-Wallis, utilizando o pacote estatístico Statistix 8.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As alterações observadas nos animais experimentais iniciaram nas primeiras 72hs após a inoculação com *C. albicans*, sendo observadas no decorrer das quatro semanas do estudo alteração nos seguintes parâmetros clínicos: apatia, sangramento nasal, andar em círculo, lateralidade da cabeça, incoordenação e óbitos (Tabela 1).

Essas alterações analisadas estatisticamente resultaram em diferenças significativas quando comparados os animais pertencentes aos grupos T1, T2, T3 em relação ao controle negativo (T4) ($p < 0,05$), sendo que o grupo diluente apresentou um maior número de animais afetados em relação aos grupos tratados.

As alterações neurológicas observadas, assim como o retroisolamento da levedura demonstraram o acometimento do SNC durante a candidíase experimental. O envolvimento de SNC ocorre com grande frequência em prematuros que desenvolvem candidemia (Kan & Lin, 2002). Segundo dados obtidos de necropsias, 20% dos pacientes com sepse por *Candida* que evoluem a óbito apresentam lesões fúngicas em SNC (Kan & Lin, 2002; Colombo & Guimarães, 2003).

Tabela 1 - Alterações clínicas observadas nos animais experimentais com candidíase sistêmica durante o período de 30 dias do estudo.

	T1					T2					T3					T4				
	Avaliação*					Avaliação					Avaliação					Avaliação				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Incoordenação	0	4	4	4	4	0	1	1	0	2	0	0	0	0	0	0	3	4	4	5
Lateralidade	0	3	4	4	4	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	2	4	4	5
Sangue Nasal	1	3	2	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3	3
Apatia	1	3	3	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	3	3	5	5	4
Andar círculos	0	2	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	3	3	3

*Avaliação realizada a cada 6 dias, totalizando cinco observações, por animal em cada um dos grupos experimentais; T1: Tratado com óleo a 1,5%; T2: Tratado com óleo a 3%; T3: Tratados com Fluconazol (10mg/Kg); T4: Tratados com suspensão contendo 0,001% de Tween 80.

Durante o período experimental, ocorreu o óbito de 33% (4/12) dos animais pertencentes ao grupo T4, controle negativo, sendo que dois animais morreram nas primeiras 72hs do estudo, um no dia 4 e outro no dia 14. Um animal do grupo T1 teve morte natural no dia 14, e uma morte natural no grupo T2 no dia sete. Os resultados demonstraram diferenças estatísticas ($p=0,004$) entre o grupo T4 e os demais (T1, T2, T3). Todos os animais foram imediatamente necropsiados e coletados todos os órgãos para análise histopatológica. De forma geral, 40 a 60% dos pacientes que desenvolvem candidemia morrem durante a internação na qual houve a fungemia, sendo a alta mortalidade decorrente particularmente do diagnóstico tardio e à gravidade das comorbidades (Colombo & Guimarães, 2003).

As alterações macroscópicas quando presentes estiveram na forma de lesões nodulares e esbranquiçadas especialmente nos rins, seguidos por fígado, baço, e bexiga, ocorrendo de forma localizada ou disseminada. Observaram-se lesões e

destruição da região medular dos rins e formação de bolas fúngicas em alguns animais, especialmente naqueles do grupo T4. No cérebro observou-se perda das circunvoluções e alteração na consistência do órgão.

Não houve diferenças entre os grupos de tratamento para as alterações macroscópicas nos órgãos avaliados, com exceção do rim, onde os animais pertencentes ao grupo tratado fluconazol diferiram em relação aos demais grupos. Segundo alguns autores, a *Candida* tem tropismo pelos rins, tendo sido demonstrado 90% de envolvimento renal em pacientes que foram à necrópsia após candidíase generalizada (Lacaz et al., 2002; Souto & Dias, 2003).

No estudo a levedura foi retroisolada de órgãos vitais, sendo principalmente dos rins, além de ser isolada da urina e sangue (Tabela 4). Segundo a literatura, no caso de infecção sistêmica, o diagnóstico baseia-se na visualização e isolamento da levedura dos órgãos, ou em espécimes clínicos como urina, aspirado, biópsia e sangue (Nucci et al., 1998; Kan & Lin, 2002). Os animais durante o período experimental receberam terapia imunossupressora, sendo este um dos fatores associados à infecção sistêmica por *Candida* (Nucci et al., 1998; Colombo & Guimarães, 2003).

Tabela 2 – Retroisolamento de *C. albicans* de órgãos vitais, sangue e urina dos animais experimentais após cultura em agar sabouraud dextrose a 35 °C.

Órgãos	T1	T2	T3	T4
Rins	12 ^a	10 ^{ab}	7 ^b	12 ^a
Fígado	9 ^{ab}	7 ^{ab}	5 ^b	11 ^a
Cérebro	9 ^{ab}	7 ^{ab}	4 ^b	12 ^a
Sangue	2	1	0	4
Urina	2	0	0	3

T1: Tratado com óleo a 1,5%; **T2:** Tratado com óleo a 3%; **T3:** Tratados com Fluconazol (10mg/Kg); **T4:** Tratados com suspensão contendo 0,001% de Tween 80.

A análise estatística do retroisolamento obtido a partir do cultivo dos órgãos específicos, não demonstrou diferenças estatísticas entre os grupos tratados, porém foi observada diferença entre o grupo T3 e T4 ($p=0,005$).

Ao analisar a eficácia dos tratamentos (T1, T2, T3) na candidíase experimental sistêmica, observou-se que o fluconazol (T3) demonstrou melhores resultados, seguido pelo T2 (Óleo 3%) que não diferiu significativamente do (T3). Estes resultados são muito promissores já que o óleo essencial apresentou resultados próximos ao antifúngico padrão utilizado. O T1 (Óleo 1,5%), não demonstrou ser eficaz no tratamento, quando comparado ao controle positivo (T3) e ao óleo 1,5%(T2), porém foi melhor que o controle negativo (T4). Os resultados observados para o T3 deve-se a indicação terapêutica deste para o tratamento da candidíase disseminada, tendo em vista que o fluconazol apresenta eficácia, segurança e altos níveis de distribuição nos líquidos corpóreos (Santos Jr. et al., 2005).

O óleo essencial utilizado para o tratamento foi extraído previamente e apresentava a seguinte composição química: alfa- felandreno, alfa-terpineno, limoneno, linalol, gama-terpineno, 4-terpineol, alfa-terpineol, timol, carvacrol e beta-

cariofileno. Com relação à atividade antifúngica do óleo essencial do *O. vulgare* frente a leveduras, vários estudos têm sido desenvolvidos (Lambert et al., 2001; Chami et al., 2004; Giordani et al, 2006), porém com grandes variações quanto ao método de análise da suscetibilidade *in vitro*; quanto a modelos experimentais utilizados; composição do óleo essencial, assim como, utilização de compostos isolados do óleo (Lambert et al., 2001). Entretanto, estudos em modelos experimentais tem demonstrado boa atividade de compostos isolados do óleo essencial, assim como do óleo puro (Chami & Chami; 2004).

Mesmo sendo reconhecidas as propriedades antimicrobianas, pertencentes as espécies de *Origanum*, o mecanismo de ação dos extratos e/ou óleo essencial ainda não está completamente elucidado, não se conhecendo o exato modo de ação frente aos fungos, porém diversos estudos tem sido conduzidos neste sentido (Cox et al., 2000; Lambert et al.; 2001).

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados pode-se concluir que o óleo essencial do *Origanum vulgare* apresenta-se como um promissor agente antifúngico, demonstrando bons resultados no tratamento da candidíase experimental sistêmica.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq; CAPES; FAPERGS e PROPESC/UFRGS.

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.
- 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.
- COLOMBO, A.L.; GUIMARÃES, T. Epidemiologia das infecções por *Candida* spp. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.36(5), p.599-607, 2003.
- COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **J. Applied Microb.**, v.88, p.170-175, 2000.
- DAFERERA, J.D.; ZIOGAS, N.B.; POLISSIOU, G.M. GC-MS analysis of essential oils from some Greeks aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **J. Agric. Food Chem.**, n.48, p. 2576-2581, 2000.
- GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; PORTUGAL, H. Potentiation of Antifungal Amphotericin B by Essential Oil from *Thymus vulgaris*. **Phytot. Res.**, 18:990-995, 2004.
- KAN LW, LIN JD. Management of systemic candidal infections in the intensive care unit. **Amer. J. Health Syst. Pharmac.**, v.59, p.33-41, 2002.
- LACAZ, C.S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9.ed., São Paulo: Sarvier, 2002, 1104p
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the MIC and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **J Appl Microb.**, v.91, p.453-462, 2001.

MORETTI, A.,L. BONCIO, B. POSTERARO, L. MECHELLI; M. BALDUCCI. Co-cutaneous infection in a dog: pcr-reverse identification of *C. tropicalis* on skin biopsy. **J. Mycol. Med.** v.16, p.30-36, 2006.

NUCCI M, COLOMBO AL, SILVEIRA F, RICHTMAN R, SALOMÃO R, BRANCHINI ML, SPECTOR N. Risk factors for death in patients with candidemia. **Infec. Contr. Hosp. Epidem.**, n.19, p. 846-850, 1998.

SANTOS JR., I.D.S; SOUZA, I.A.M.; BORGES,R.G.; SOUZA, L.B.S.; SANTANA, W.J.; COUTINHO, H.D.M. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Sc. Med.**, v.15, n.3, 2005.

SOUTO, C.A.V., DIAS, B.S. Infecção do Trato Urinário por Fungos. **Intern. Braz. J. Urol.**,v.29,s.3, p. 21-27, 2003.

YAMAGUCHI, H. (1987). In: M. Miyaji(Ed.1). *Opportunistic Fungal Infections. Candidiasis in Animal Models in Medical Mycology*. CRC Press: Boca Raton. pp.111-112 e 144-151, 1987.