

Óleo essencial de *Origanum vulgare* no tratamento da esporotricose experimental cutânea

Origanum vulgare essential oil in the treatment of skin experimental sporotrichosis

Aceite esencial de *Origanum vulgare* en el tratamiento de la esporotricosis experimental de la piel

Recebido: 15/05/2023 | Revisado: 24/05/2023 | Aceitado: 25/05/2023 | Publicado: 30/05/2023

Caroline Bohnen de Matos

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2277-5718>

Prefeitura Municipal de Capão do Leão, Brasil

E-mail: bohnencarol@gmail.com

Karina Affeldt Guterres

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9762-8117>

Universidade de Caxias do Sul, Brasil

E-mail: guterres.karina@gmail.com

Cristine Cioato da Silva Guim

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6494-4049>

Prefeitura Municipal de Pelotas, Brasil

E-mail: criscioato@hotmail.com

Stefanie Waller

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6719-1794>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: waller.stefanie@yahoo.com.br

Marlete Brum Cleff

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9082-5185>

Universidade Federal de Pelotas, Brasil

E-mail: marletecleff@gmail.com

Resumo

A esporotricose tem emergido como uma importante doença zoonótica em grandes centros urbanos. Seu tratamento é realizado através da administração de antifúngicos por períodos prolongados, sendo restritos os princípios ativos utilizados, necessitando de outras opções terapêuticas. Dessa forma, o presente estudo visa determinar a atividade do óleo de *Origanum vulgare* no tratamento da esporotricose cutânea experimental. Para isso, foram utilizados 40 ratos machos da linhagem Wistar divididos em quatro grupos experimentais, inoculados com *S. brasiliensis* e submetidos a 30 dias de tratamento. Semanalmente, os animais eram avaliados e dois animais por grupo eram eutanasiados para a coleta de material para analisar o desenvolvimento da doença e a evolução dos diferentes tratamentos. Ao final dos 30 dias, os animais remanescentes foram eutanasiados e, também, tiveram materiais biológicos coletados para análises. Os animais pertencentes aos grupos itraconazol e controle não apresentaram desaparecimento total dos sinais clínicos durante o experimento. Os animais tratados com o óleo essencial, não apresentaram nenhuma alteração microscópica em rins, fígado e baço durante todo o período. O fungo foi retroisolado do linfonodo regional de todos os animais de todos os grupos nas quatro necropsias realizadas.

Palavras-chave: Ação antifúngica; Esporotricose; *Origanum vulgare*.

Abstract

Sporotrichosis has emerged as a major zoonotic disease in large urban centers. Its treatment is performed through the administration of antifungals for prolonged periods, being restricted the active ingredients used, requiring other therapeutic options. Thus, the present study aims to determine the activity of *Origanum vulgare* oil in the treatment of experimental cutaneous sporotrichosis. Forty male Wistar rats were divided into four experimental groups, inoculated with *S. brasiliensis* and submitted to 30 days of treatment. Weekly, the animals were evaluated and two animals per group were euthanized to collect material to analyze the development of the disease and the evolution of the different treatments. At the end of 30 days, the remaining animals were euthanized and also had biological materials collected for analysis. The animals belonging to the itraconazole and control groups did not show complete disappearance of clinical signs during the experiment. The animals treated with the essential oil did not show any microscopic alteration in the kidneys, liver and spleen during the whole period. The fungus was retroisolated from the regional lymph node of all animals of all groups in the four necropsies performed.

Keywords: Antifungal action; Sporotrichosis; *Origanum vulgare*.

Resumen

La esporotricosis se ha convertido en una enfermedad zoonótica importante en los grandes centros urbanos. Su tratamiento se realiza mediante la administración de antifúngicos por tiempo prolongado, restringiéndose los principios activos utilizados, requiriendo otras opciones terapéuticas. Así, el presente estudio tiene como objetivo determinar la actividad del aceite de *Origanum vulgare* en el tratamiento de la esporotricosis cutánea experimental. Para ello, 40 ratas Wistar macho fueron divididas en cuatro grupos experimentales, inoculadas con *S. brasiliensis* y sometidas a 30 días de tratamiento. Semanalmente se evaluaron los animales y se sacrificaron dos animales por grupo para la recolección de material para analizar el desarrollo de la enfermedad y la evolución de los diferentes tratamientos. Al final de los 30 días, los animales restantes fueron sacrificados y también se recogieron materiales biológicos para su análisis. Los animales pertenecientes a los grupos de itraconazol y control no mostraron una desaparición completa de los signos clínicos durante el experimento. Los animales tratados con el aceite esencial no mostraron cambios microscópicos en los riñones, el hígado y el bazo durante todo el período. El hongo fue retroaislado del ganglio linfático regional de todos los animales de todos los grupos en las cuatro necropsias realizadas.

Palabras clave: Acción antifúngica; Esporotricosis; *Origanum vulgare*.

1. Introdução

No Brasil, o principal microrganismo relacionado aos casos de esporotricose humana e animal é o *Sporothrix brasiliensis* (Rodrigues et al., 2013), o qual é resultante de um desdobramento clonal da espécie *S. schenckii* sensu stricto, sendo considerada a espécie mais patogênica dentro do complexo *Sporothrix schenckii* (Fernandes et al., 2013; Marimon et al., 2007, 2008). Diferentes manifestações clínicas são observadas nos hospedeiros, variando de forma cutânea, como linfocutânea, cutânea-fixa ou disseminada, a formas extra cutâneas (Lopes-Bezerra et al., 2006), com envolvimento sistêmico através da propagação hematogênica do agente do local de inoculação primário (Mahajan, 2014).

Independentemente da forma de manifestação da doença, o tratamento da esporotricose é baseado na administração de antifúngicos (Freitas, 2014; Mahajan, 2014), sendo o itraconazol o principal fármaco de escolha para o tratamento de casos clínicos humanos e, principalmente, animais com esta micose (Barros et al., 2011). Entretanto, estudos *in vitro* de suscetibilidade a antimicrobianos tem demonstrado que isolados de pacientes apresentam uma menor suscetibilidade ao itraconazol, fato este que provavelmente contribui para a falha terapêutica, principalmente em pacientes com a forma mais grave da doença (Bustamante e Campos, 2004; Schubach et al., 2004). A resistência às drogas antimicrobianas geralmente é causada pela mutação espontânea e recombinação gênica, que desenvolvem variedades genéticas onde a seleção natural acontece dando vantagens às mais resistentes (Santos et al., 2017).

O abandono e a solicitação de eutanásia do paciente por parte dos tutores, são fatores que também são comumente observados, principalmente pelo fato de que existe um longo período de tratamento, além da possibilidade de aquisição da doença por um membro da família (Pereira et al., 2009; Schubach et al., 2004).

Nas últimas décadas, houve um ressurgimento do interesse nas plantas como fontes de novos agentes terapêuticos. Grandes companhias investiram na pesquisa com extratos vegetais, a fim de descobrir novas substâncias ativas, tanto que 2/3 dos medicamentos lançados nos últimos anos nos Estados Unidos da América provém direta ou indiretamente de plantas (Duarte, 2006). Neste sentido, a pesquisa com extratos vegetais tem obtido destaque, uma vez que os resultados demonstram ação de diversas plantas em fungos de importância veterinária (Cleff et al., 2008), inclusive em diferentes extratos vegetais, tais como óleo essencial e extrato hidroalcolico de *Origanum vulgare*, os quais têm apresentado efeitos antimicrobianos frente a bactérias, fungos e parasitos (Cleff et al., 2013; Guterres, 2015; Matos et al., 2016; Santin et al., 2014; Waller et al., 2016). Em sua maioria, estes estudos são realizados através da utilização de técnicas *in vitro*, como difusão, diluição ou bioautografia (Henriques et al., 2009).

Diante da problemática em relação a existência de isolados fúngicos resistentes do *Sporothrix brasiliensis* ao tratamento convencional e à ocorrência de susceptibilidade *in vitro* dessa espécie patogênica ao óleo essencial de *Origanum vulgare*, este estudo objetivou avaliar a atividade *in vivo* deste óleo essencial no tratamento da esporotricose experimental cutânea por *Sporothrix brasiliensis* resistente ao itraconazol.

2. Metodologia

O experimento teve aprovação do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas, sob o número de processo 23110.001622/2012-55.

As folhas secas de *Origanum vulgare* foram adquiridas de distribuidor comercial com certificação botânica, e para obtenção do óleo essencial as folhas foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger durante 4 horas, segundo a Farmacopeia Brasileira IV. A secagem foi realizada através da utilização do sulfato de sódio anidro p.a, sendo, por fim, o óleo essencial foi estocado em frasco âmbar e sob refrigeração. A análise dos compostos químicos do óleo essencial de *O. vulgare* foi realizada por cromatografia gasosa, no Laboratório de Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) da Universidade Federal de Pelotas. Sendo a amostra comparada com padrões cromatográficos adquiridos comercialmente.

Para a realização do teste *in vivo*, foi utilizado um isolado de *Sporothrix brasiliensis* proveniente de um caso clínico em felino, oriundo da micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas (UFPeL). Para o preparo do inóculo fúngico foi cultivado em ágar batata dextrose (PDA) a 28°C, durante 7 dias, para a obtenção da fase filamentosa do fungo. Posteriormente, foi retirada uma alíquota da cultura e colocada em tubo de ensaio contendo água destilada estéril, tendo sua turbidez ajustada através do espectrofotômetro em 70% de transmitância, alcançando densidade final de 2×10^3 células/mL. Este preparo de inóculo de fúngico foi, portanto, aplicado nos animais experimentais para promover a infecção experimental.

Para a realização do teste *in vivo* foram utilizados 40 ratos (*Rattus norvegicus*) machos, adultos e albinos da linhagem Wistar. Os animais foram acomodados em caixas no Biotério Central da UFPeL e em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro recebendo, dieta de acordo com peso corporal e água *ad libitum* durante todo o experimento.

Todos os animais foram sedados e inoculados pela via subcutânea no coxim plantar esquerdo com 0,2 mL de suspensão do inóculo fúngico de *S. brasiliensis*. O tratamento dos animais experimentais foi iniciado dez dias após a inoculação fúngica, onde os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (n : 10), recebendo administração diária oral (1mL), durante 30 dias, de Itraconazol (ITRA, 10mg/kg); óleo essencial de *Origanum vulgare* a 3% (OEO); associação de óleo essencial de *O. vulgare* a 3% com Itraconazol a 10mg/kg (OEO+ITRA); CONT (Tratados com o veículo - propilenoglicol). Para a administração oral, as soluções dos tratamentos foram administradas com auxílio de sonda oro-gástrica. O itraconazol foi adquirido de distribuidor comercial, tendo o nome comercial preservado por questões éticas, e, juntamente com o óleo essencial foi encaminhado a uma farmácia de manipulação para a realização das soluções que seriam administradas nos animais, sendo o propilenoglicol o veículo utilizado para todas as soluções.

Durante o período experimental, foi observado a mortalidade, a sobrevivência e a evolução da enfermidade em todos os animais.

A cada sete dias era realizada a necropsia de dois animais de cada grupo, para o acompanhamento do tratamento, sendo coletados fígado, rim, baço, testículo e linfonodo regional para análise microbiológica e histopatológica. Ao final do período de tratamento, os sobreviventes de cada grupo foram necropsiados e tiveram suas amostras coletadas e encaminhadas para as respectivas análises. Todas eutanásias foram realizadas através do uso dos fármacos xilazina e quetamina, para anestesia prévia, seguidos de uma dose elevada de tiopental intravenoso, conforme a resolução nº 1000, de 11 de maio de 2012 do CFMV.

3. Resultados e Discussão

Dez dias após a inoculação fúngica, deu-se início a administração dos diferentes tratamentos nos animais experimentais. Nesse momento (dia zero), realizou-se uma avaliação clínica dos animais, sendo possível observar que todos os ratos apresentavam edema no membro posterior esquerdo, aumento no linfonodo poplíteo, presença de secreção purulenta no ponto

de inoculação e dificuldade de locomoção. A presença de secreção purulenta e lesões nodulares indicam que o animal desenvolveu a doença, podendo ser iniciado o tratamento (Antunes et al., 2009), o qual foi observado em todos os animais, indicando a ocorrência da infecção experimental.

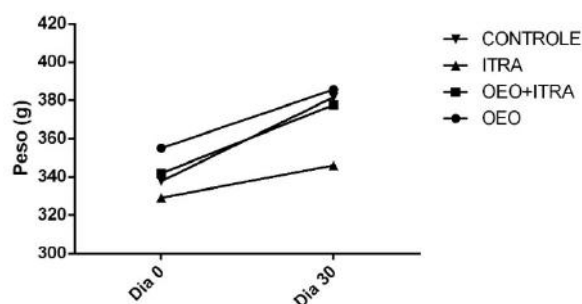
Durante as quatro semanas de tratamento, os animais foram avaliados clinicamente, sendo observados a presença de edema, de exsudato no ponto de inoculação, dificuldade de locomoção, aumento de linfonodo regional e registrado, quando estiveram presentes, outras alterações. Os grupos tratados com *O. vulgare* (OEO e OEOI) ao final do tratamento, apresentaram remissão do edema ao fim do período experimental, assim como ocorrência de cicatrização no local de inoculação. Entretanto, os grupos ITRA e CONT não apresentaram desaparecimento total dos sinais observados inicialmente. Segundo a literatura, animais com esporotricose cutânea experimental, tratados com itraconazol, tendem a ter a lesão cicatrizada ao final de 30 dias (Antunes et al., 2009), fato não observado durante o estudo, uma vez que mesmo depois de 30 dias de tratamento, os animais tratados com itraconazol ainda apresentavam lesões no ponto de inoculação, edema no membro e aumento do linfonodo poplíteo.

O isolado utilizado para o estudo tratou-se de um isolado felino armazenado na micoteca (MicVet – UFPel), tendo como característica ser produtor de melanina. A capacidade de produzir melanina por parte dos isolados de *Sporothrix* tem sido descrita como um importante fator de virulência (Mario et al., 2016; Romero-Martinez et al., 2000) Estudos *in vitro*, avaliando a sensibilidade de isolados humanos e animais, vem descrevendo a existência de uma resistência maior por parte dos isolados de animais, especialmente de isolados de felinos em relação aos de humanos (Marimon et al., 2007; Meinerz et al., 2007; Oliveira et al., 2011).

Ainda, o uso indiscriminado de antifúngicos (Schubach et al., 2004) também é um fator contribuinte para essa problemática. Ao avaliar a suscetibilidade *in vitro* de fungos do complexo *Sporothrix schenckii* pertencentes aos estados brasileiros do RS, RJ, MG e SP frente ao itraconazol, Stopiglia et al. (2014) demonstraram a existência de isolados resistentes no estado do Rio Grande do Sul, região geográfica a qual o isolado clínico felino de *Sporothrix brasiliensis* foi utilizado na presente experimentação animal (Stopiglia et al., 2014). Apesar escassez de estudos pertinentes fatores de virulência do *Sporothrix* spp. para o desenvolvimento de resistência *in vitro* aos antifúngicos, a termotolerância, a atividade proteolítica, a produção de urease, produção de adesinas, existência do peróxido de ergosterol (Freitas, 2014), além da produção de melanina, são fatores contribuintes. Diante desse cenário, é notória a necessidade em avançar os estudos em produtos alternativos ao tratamento convencional na esporotricose humana e animal, a fim de promover uma alternativa aos casos clínicos refratários por resistência ao itraconazol.

Na avaliação clínica, um ganho de peso crescente foi observado em todos os grupos experimentais, exceto no grupo tratado com itraconazol (Figura 1), mostrou um comportamento discrepante uma vez que, na última semana de tratamento, os animais apresentaram uma queda no ganho de peso. Essa observação pode estar relacionada a um dos efeitos adversos do itraconazol em gatos, que é a perda de peso e apatia (Pereira et al., 2009).

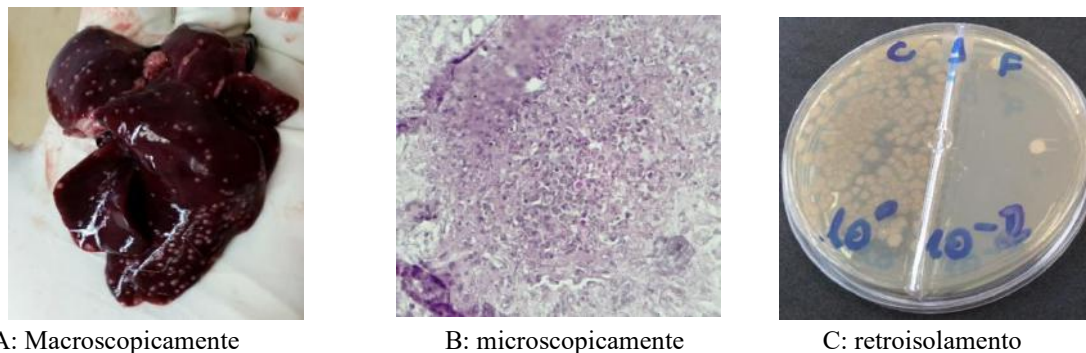
Figura 1 - Média dos pesos dos animais nos diferentes grupos no início e no fim do tratamento.



Fonte: Dados gerados através de um programa estatístico Statistix®.

Durante as necropsias, observamos diversas alterações macroscópicas, como presença de pontos esbranquiçados, degeneração e aspecto friável nos rins, fígado (Figura 2A) e baço dos animais. A avaliação histopatológica dos órgãos nos mostrou que as alterações observadas macroscopicamente como pontos esbranquiçados e degeneração foram classificadas microscopicamente como sendo presença de granulomas multifocais, infiltrado mononuclear e presença de células fúngicas (Figura 2B). O grupo de animais tratados com o óleo essencial de *O. vulgare* não apresentou nenhuma alteração microscópica em rins, fígado e baço durante todo o experimento. Lesões do tipo piogranulomatosas e granulomatosas são descritas como clássicas nos casos da esporotricose (Antunes et al., 2009; Fontes et al., 2016; Madrid et al., 2007).

Figura 2 - Lesões observadas no fígado dos animais do grupo controle.

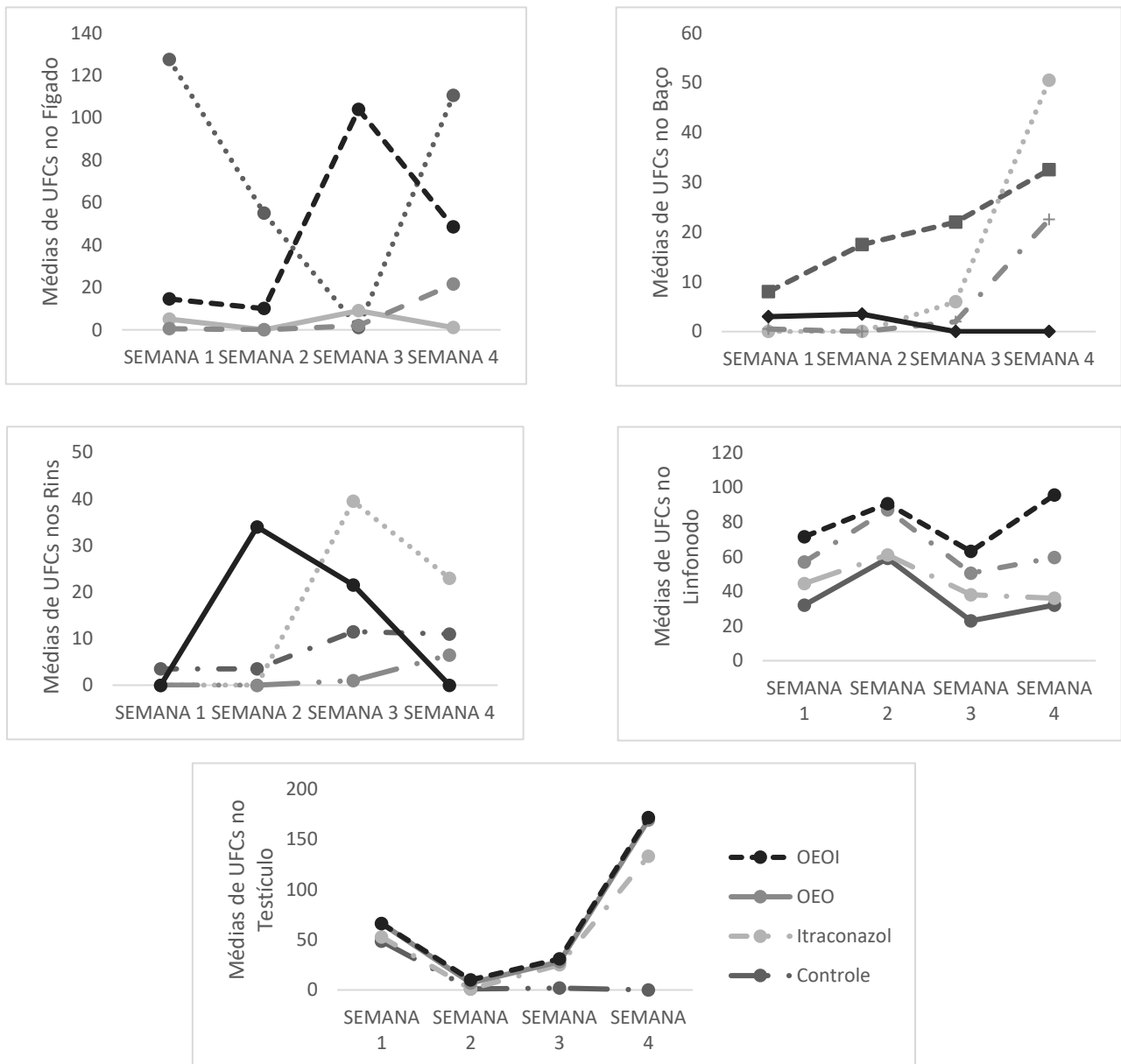


Fonte: Fotos do acervo pessoal realizadas durante o experimento.

Os achados histopatológicos dos coxins plantares dos grupos CONT, ITRA, OEO, OEOI nos revelaram que, mesmo depois de 4 semanas de tratamento, todos os grupos experimentais apresentavam células fúngicas no coxim plantar (ponto de inoculação), diferentemente do observado em um estudo realizado avaliando a ação do itraconazol e da terbinafina frente a esporotricose experimental cutânea, onde foi possível observar a remissão das lesões e o desaparecimento das estruturas fúngicas no grupo tratado com itraconazol (Antunes et al., 2009). Além disso, todos os grupos apresentaram área focal extensa de infiltrado piogranulomatoso e necrose. É importante ressaltar que, apesar de existir a presença de infiltrado piogranulomatoso e estruturas fúngicas nos coxins dos animais pertencentes ao grupo tratado com o óleo essencial, o tratamento foi eficaz na prevenção da disseminação do agente para órgãos como fígado, rins e baço, não ocorrendo o mesmo nos demais grupos estudados.

Mesmo sendo efetivo o tratamento com itraconazol, em muitos pacientes felinos, casos de falha terapêutica têm sido descritos (Gremião et al., 2011; Schubach et al., 2004). Crothers e colaboradores (2009) descreveram um caso de um felino com esporotricose, com lesões localizadas na região nasal, tratado com itraconazol, por via oral na dose de 10 mg/kg/dia, por um período de 4 anos. Segundo Malik et al. (2004), micoses localizadas na região nasal nos felinos são de difícil cura. A falha terapêutica também vem sendo associada ao uso indiscriminado do itraconazol nas clínicas médicas humanas e veterinárias (Bustamante e Campos, 2004; Meinerz et al., 2007). O abandono e a solicitação de eutanásia do paciente por parte dos tutores, são fatores que também são comumente observados, principalmente pelo fato de que existe um longo período de tratamento, além da possibilidade de aquisição da doença por um membro da família (Pereira et al., 2009; Schubach et al., 2004). O retroisolamento do *Sporothrix brasiliensis* fungo nos órgãos coletados ocorreu nos diferentes grupos no decorrer das semanas conforme ilustrado nos gráficos a seguir (Figura 3). Essa espécie é resultante de um desdobramento clonal da espécie *Sporothrix schenckii* sensu stricto e é considerada a mais patogênica dentro do complexo (Fernandes et al., 2013). Borba-Santos et al. (2015) ao avaliarem a atividade *in vitro* de inúmeros isolados de *S. brasiliensis* frente ao itraconazol observaram que isolados recentes (2011-2012) apresentaram valores maiores de CIM e CFM que isolados obtidos antes de 2004, sugerindo a ocorrência de alterações que tornaram o microrganismo resistente aos antifúngicos utilizados para o tratamento da micose.

Figura 3 - Média de unidades formadoras de colônias nos diferentes órgãos coletados durante as 4 semanas de tratamento.



Fonte: Gráficos gerados através do programa estatístico Statistix®.

Não existe valores de CIM e CFM padronizados para o itraconazol frente ao *S. brasiliensis*, porém diversos autores consideram o microrganismo sensível ao fármaco quando os valores de CIM são menores ou iguais a 1µg/mL (Mcginnis et al., 2001; Meinerz et al., 2007; Rex et al., 2001).

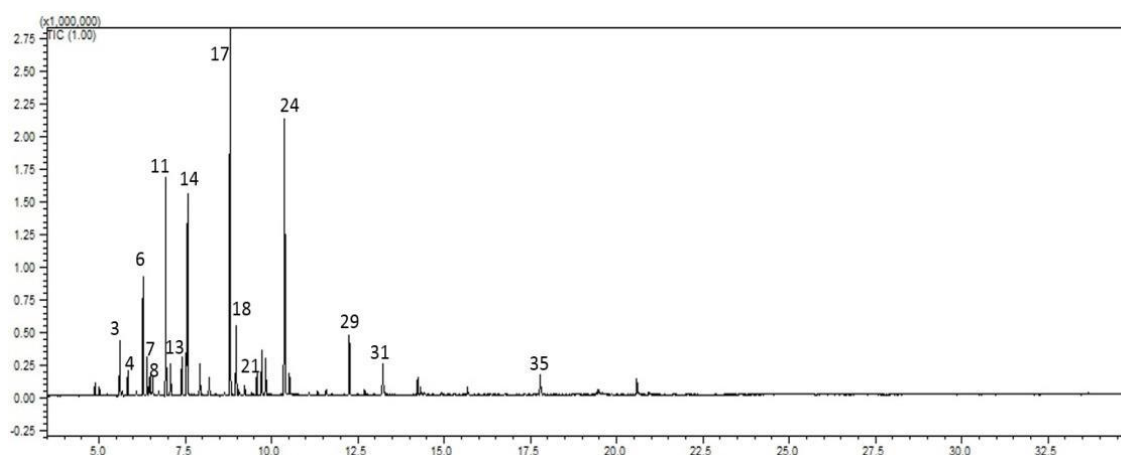
A ação antifúngica de extratos de *Origanum vulgare*, principalmente na forma de óleo essencial, vem sendo avaliada e comprovada por diversos autores (Castro et al., 2013; Cleff et al., 2008, 2013; Santin et al., 2014). Cleff et al. (2013) testaram diferentes óleos essenciais de *Origanum vulgare* frente a isolados de *Candida* sp. e obtiveram resultados diferentes em relação a CIM. Ao analisarem a composição química dos óleos testados, foi possível notar que houve uma diferença nas concentrações dos compostos majoritários, justificando resultados divergentes de CIM obtidos durante o estudo (CLEFF et al., 2013). Couto et al. (2015) ao avaliarem a ação *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* frente a isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, através da utilização de técnicas de microscopia eletrônica, observaram que, o óleo essencial causa alterações morfológicas na estrutura fúngica similar ou até mesmo maiores que as observadas nas drogas como anfotericina B e cetoconazol.

Através de testes de toxicidade, foi possível observar que, quando administrado por via oral, o óleo essencial de *O. vulgare*, na concentração de 3%, não possui efeitos tóxicos e é considerado seguro para a administração, não sendo recomendado para machos e fêmeas em fase reprodutiva (Hollenbach, 2013).

Concomitantemente com os estudos acerca de sua ação e de seus efeitos no organismo, vem-se tentando elucidar quais seriam os principais componentes que estão envolvidos na sua ação, para tal, se faz necessário a análise dos constituintes através da cromatografia.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *O. vulgare* utilizado neste estudo demonstrou a presença de 15 compostos, destacando-se o γ -terpinene (11), 4-terpineol (17), α -terpineol (18) e Hidroxy-p-cymene (24) (Figura 4). Seus componentes bioativos têm atividade antimicrobiana bem documentada, com atividade inibitória contra bactérias Gram positivas e Gram negativas e fungos, inclusive o *Sporothrix* spp. (Lis-Balchin et al., 1998; Delaquis et al., 2002; Sagdiç e Özcan, 2003; Nazer et al., 2005; Seydim e Sarikus, 2006; Cleff et al., 2010).

Figura 4 - Cromatograma do óleo essencial de orégano, evidenciando os compostos β -terpinene (3), β -pinene (4), (+)-4-carene (6), o-cymol (7), (+)-sylvestrene (8), γ -terpinene (11), 2-carene (13), 5-isopropyl-2-methylbicyclo [3.1.0] hexan-2-ol (14), 4-terpineol (17), α -terpineol (18), Thymolmethylester (21), Hidroxy-p-cymene (24), β -caryophyllene (29), γ -elemene (31), Methylpalmitate (35).



Fonte: Autores.

Sabe-se que fenóis, como carvacrol, timol, gamaterpeno e p-cimeno, representam 70,2% a 98% dos compostos ativos do óleo de *O. vulgare* (Bampidis et al., 2005) porém, estudos demonstram que a atividade antimicrobiana não se deve somente à presença de carvacrol e timol, mas a presença de outros componentes que, em baixas concentrações, podem provocar interações sinérgicas, aditivas ou antagônicas (Chorianopoulos et al., 2004).

Baydar et al. (2004) ao testarem dois óleos essenciais de *O. vulgare*, um com 53% de carvacrol e timol e outro com 87%, observaram que o com menor concentração destes constituintes apresentou uma ação antimicrobiana mais efetiva, sendo atribuída a presença de p-cimeno e γ -terpineno, quando comparado ao que apresentava maior concentração de timol e carvacrol. (Ultee et al., 2000) afirma que, quando utilizado isoladamente, o p-cimeno não tem efeito antibacteriano, porém, se combinado ao carvacrol, ocorre um sinergismo entre os dois, potencializando o efeito do carvacrol.

Outro fator importante na determinação da composição química de um extrato é o fato de que o cultivo botânico, como tipo de clima, sazonalidade, área geográfica, condição de cultura, bem como fatores relacionados ao processamento destas plantas, como tipo de técnica de obtenção dos seus óleos, condições de secagem e armazenamento, entre outras, podem influenciar na maior produção de um determinado composto químico (Badke et al., 2011; Silva et al., 2008).

Cleff et al. (2013) testaram diferentes óleos essenciais de *Origanum vulgare* frente a isolados de *Candida* sp. e obtiveram resultados diferentes em relação a CIM. Ao analisarem a composição química dos óleos testados, foi possível notar que houve uma diferença nas concentrações dos compostos majoritários, justificando resultados divergentes de CIM obtidos durante o estudo (Cleff et al., 2013).

Couto et al. (2015) ao avaliarem a ação *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* frente a isolados de *S. schenckii* e *S. brasiliensis*, através da utilização de técnicas de microscopia eletrônica, observaram que, o óleo essencial causa alterações morfológicas na estrutura fúngica similar ou até mesmo maiores que as observadas nas drogas como anfotericina B e cetoconazol.

4. Conclusão

Ao acompanhar a evolução clínica dos animais com esporotricose experimental cutânea causada pelo *S. brasiliensis*, pudemos concluir que, os animais tratados com o óleo essencial de *O. vulgare* e óleo essencial de *O. vulgare* associado ao itraconazol apresentaram remissão do edema, assim como ocorrência de cicatrização no local de inoculação. Entretanto, o grupo tratado com itraconazol e o grupo controle não apresentaram desaparecimento total dos sinais observados inicialmente, indicando a não remissão clínica da doença.

Ao final do experimento, com os dados obtidos até o momento através das avaliações macroscópicas e microscópicas dos diversos órgãos coletados, observamos que, os animais pertencentes aos grupos tratados com o óleo essencial de *O. vulgare* não apresentaram nenhuma alteração microscópica em rins, fígado e baço durante todo o experimento, diferentemente dos animais dos demais grupos experimentais, indicando assim um possível efeito dessa planta impedindo a disseminação da doença.

Referências

- Antunes, T. A., Nobre, M. O., Faria, R. O., et al. (2009) Esporotricose cutânea experimental: Avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 42 (6), 706–710.
- Badke, M. R., Ressel, L. B., Budó, M. L. D., & Silva, F. M. (2011) Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Escola Anna Nery*, 15 (1), 132–139.
- Bampidis, V. A., Christodoulou, V., Florou-Paneri, P., et al. (2005) Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. *British Poultry Science*, 46(5), 595–601.
- Barros, M. B. L., Paes, R. A., & Schubach, A. O. (2011) *Sporothrix schenckii* and Sporotrichosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), 633–654.
- Baydar, H., Sağdıç, O., Özkan, G., & Karadoğan, T. (2004) Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*, 15(3), 169–172.
- Bustamante, B., & Campos, P. E. (2004) Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. *Expert Review of Anti-infective Therapy*, 2(1), 85–94.
- Castro, L. L. D., Madrid, I. M., Aguiar, C. L. G., et al. (2013) *Origanum vulgare* (Lamiaceae) ovicidal potential on gastrointestinal nematodes of cattle. *Ciência Animal Brasileira*, 14(4), 508–513.
- Chorianopoulos, N., Kalpoutzakis, E., Aligiannis, N., et al. (2004) Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(26), 8261–8267.
- Cleff, M. B., Madrid, I. M., Meinerz, A. R. M., et al. (2013) Essential oils against *Candida* spp: *in vitro* antifungal activity of *Origanum vulgare*. *African Journal of Microbiology Research*, 7(20), 2245–2250.
- Cleff, M. B., Meinerz, A. R. M., Schuch, L. F. D., et al. (2008) Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix Schenckii*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, 60(2), 513–526.
- Duarte, M. C. T. (2006) Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Revista MultiCiência*, 7, 17.
- Fernandes, G. F., Santos, P. O., Rodrigues, A. M., et al. (2013) Characterization of virulence profile, protein secretion and immunogenicity of different *Sporothrix schenckii sensu stricto* isolates compared with *S. globosa* and *S. brasiliensis* species. *Virulence*, 4(3), 241–249.
- Fontes, S. D., Silva, A. S. A., & Portilho, C. A. (2016) *Esporotricose – revisão de literatura*. ANAIS SIMPAC, 6(1).
- Freitas, D. F. S. (2014) *Avaliação de fatores epidemiológicos, micológicos, clínicos e terapêuticos associados à esporotricose*. 148f. Tese (Doutorado em Medicina Tropical) Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

- Gremião, I., Schubach, T., Pereira, S., et al. (2011) Treatment of refractory feline sporotrichosis with a combination of intralesional amphotericin B and oral itraconazole. *Australian Veterinary Journal*. 89(9), 346–351.
- Guterres, K. A. (2015) *Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae*. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.
- Hollenbach, C. B. (2013) *Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (Origanum vulgare L.) em ratos Wistar*. 94f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- Lopes-Bezerra, L. M., Schubach, A., & Costa, R. O. (2006) *Sporothrix schenckii and sporotrichosis*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 78(2), 293–308.
- Madrid, I. M., Xavier, M. O., Mattei, A. S., et al. (2007) *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 44(6), 441–443.
- Mahajan, V. K. (2014) Sporotrichosis: an overview and therapeutic options. *Dermatology Research and Practice*. 2014, 272376.
- Marimon, R., Cano, J., Gené, J., et al. (2007) *Sporothrix brasiliensis, S. globosa, and S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(10), 3198–3206.
- Marimon, R. I., Serena, C., Gené, J., Cano, J., & Guarro, J. (2008) *Sporothrix* species of In Vitro Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 52(2), 732–734.
- Mario, D. A. N., Santos, R. C. V., Denardi, L. B., et al. (2016) Interference of melanin in the susceptibility profile of *Sporothrix* species to amphotericin B. *Revista Iberoamericana de Micología*. 33(1), 21–25.
- Matos, C. B., Guterres, K. A., Giordani, C., et al. (2016) Germicidal activity of plant extracts of *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* against *Sporothrix schenckii* complex. *Acta Veterinaria Brasilica*. 10(3), 246–252.
- Mcginnis, M. R., Nordoff, N., Li, R. K., Pasarell, L., & Warnock, D. W. (2001) *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole and amphotericin B. *Medical Mycology*. 39(4), 369–371.
- Meinerz, A. R. M., Nacente, P. S., Schuch, L. F. D., et al. (2007) Suscetibilidade in vitro de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 40(1), 60–62.
- Oliveira, D. C., Lopes, P. G. M., Spader, T. B., et al. (2011) Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans, S. brasiliensis, and S. luriei* of the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil. *Journal of Clinical Microbiology*. 49(8), 3047–3049.
- Pereira, S. A., Schubach, T. M. P., Gremião, I. D., et al. (2001) Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. *Acta Scientiae Veterinariae*. 37(4), 311–321.
- Rex, J. H., Pfaller, M. A., Walsh, T. J., et al. (2001) Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. *Clinical Microbiology Reviews*. 14(4), 643–658.
- Rodrigues, A. M., Teixeira, M. M., Hoog, G. S., et al. (2013) Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 7(6), 2281.
- Romero-Martinez, R., Wheeler, M., Guerrero-Plata, A., Rico, G., & Torres-Guerrero, H. (2000) Biosynthesis and Functions of Melanin in *Sporothrix schenckii*. *Infection and Immunity*. 68(6), 3696–3703.
- Santin, R., Giordani, C., Madrid, I. M., et al. (2014) Antifungal activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Malassezia pachydermatis*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 66(2), 367–373.
- Santos, C. H. S., Piccoli, R. H., & Tebaldi, V. M. R. (2017) Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e compostos isolados frente aos agentes patogênicos de origem clínica e alimentar. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*. 76, e1719.
- Schubach, T. M. P., Schubach, A. O., Okamoto, T., et al. (2004) Utilidade do coágulo sangüíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 41(6), 404–408.
- Silva, S. R. S., Demuner, A. J., Barbosa, L. C. A., et al. (2008) Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. *Acta Scientiarum. Agronomy*. 24(0), 1363–1368.
- Stopiglia, C. D. O., Magagnin, C. M., Castrillón, M. R., et al. (2014) Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brazil. *Medical Mycology*. 52(1), 56–64.
- Ultee, A., Slump, R. A., Steging, G., & Smid, E. J. (2000) Antimicrobial Activity of Carvacrol toward *Bacillus cereus* on Rice. *Journal of Food Protection*. 63(5), 620–624.
- Waller, S. B., Madrid, I. M., Cleff, M. B., et al. (2016) Effects of essential oils of *Rosmarinus officinalis* Linn. and *Origanum vulgare* Linn. from different origins on *Sporothrix brasiliensis* and *Sporothrix schenckii* complex. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 68(4), 991–999.