



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

WENDISCH, Iara¹; **FONSECA, Anelise Oliveira**²; **MEINERZ, Ana Raquel Mano**³; **MELLO, Joao Roberto Braga**³; **RODRIGUES, Maria Regina**⁴; **MEIRELES, Mario Carlos Araújo**⁵; **MADRID, Isabel Martins**⁵; **CLEFF, Marlete Brum**⁵

¹ Bolsista IC, Setor Micologia; Faculdade de Veterinária – UFPel, iarawendisch@hotmail.com;

² Graduanda Medicina Veterinária - Ufpel, anelise_fonseca@yahoo.com.br; ³ Pós-graduação em Ciências Veterinária - UFRGS, rmeinerz@bol.com.br, meloo@gabinete.ufrgs.br; ⁴ Departamento de Química Orgânica – UFPel, mreginarodrigues@terra.com.br;

⁵ Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária - UFPel, meireles@ufpel.tche.br; isabel_madrid@ufpel.tche.br; emebrum@bol.com.br

1. 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. 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 relevante problema de saúde (Sobel 1995; Ziarrustra, 2002), e profissionais da área médica têm que conhecer aspectos atuais sobre a infecção e opções de tratamento, aumentando a necessidade de pesquisas de substâncias com ação antifúngica. (Val & Almeida Jr., 2001).

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

2. MATERIAL E MÉTODOS

O *Origanum vulgare* foi adquirido em distribuidor comercial e cerca de 40g de folhas secas foram submetidas à hidrodestilação em Clevenger, segundo a Farmacopéia Brasileira, para obtenção do óleo essencial. O extrato obtido foi analisado por GC/FID, sendo caracterizado em função dos principais constituintes químicos e comparado com o tempo de retenção de padrões.

No estudo *in vivo* utilizou-se 48 ratos norvergicus (*Rattus rattus*), Wistar, fêmeas com peso médio de 240g. Os animais foram alojados no Biotério Central da

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". Os procedimentos respeitaram os princípios da ética em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Para a Candidíase experimental os animais foram ovariectomizados, tratados antes da inoculação e semanalmente com valerato de estradiol, via subcutânea e imunossuprimidos com 2 mg/L de dexametasona (Fortecortin, Merk) adicionado na água de beber (Martinez et al.;2001).

O inóculo fúngico foi preparado utilizando colônias de *C. albicans* cultivadas a 35°C por um período de 24-48hs e padronizadas em 10⁶ células de *C. albicans*/mL em PBS. 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 Agar; **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 agar a 0,8%.

Todos animais foram 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.

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 Pour 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*.

3. 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, 4-terpineol, alfa-terpineol, timol, carvacrol e beta-cariofileno. Estes resultados concordam com os dados da literatura, onde tem sido descrito que o óleo 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. 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⁻¹ e MFC igual a 2,5 µL mL⁻¹.

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

Com relação aos parâmetros clínicos avaliados, não foram observadas quaisquer alterações estatisticamente significativas nos 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 Sem 1	T1 Sem 2	T1 Sem 3	T2 Sem 1	T2 Sem 2	T2 Sem 3	T3 Sem 1	T3 Sem 2	T3 Sem 3	T4 Sem 1	T4 Sem 2	T4 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 no final e no início do experimento, dos grupos T1,T3 e T4 comparados ao T2. Essa diferença pode ser melhor explicada pelo déficit de peso inicial do grupo T2; esse grupo, apesar da aleatorização para alocação dos animais em cada tratamento, apresentou peso inicial menor do que os demais.

No hemograma, os animais dos grupos T1, T2 e T3 apresentaram valores dentro dos parâmetros fisiológicos para a espécie estudada, sendo que nos diferentes tratamentos não houve diferenças estatísticas ($p>0,05$), conforme a Tabela 2. 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 durante o estudo. 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 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. Estes resultados podem ser decorrentes da manutenção da infecção vaginal nestes animais o que poderia estar, causando alterações sistêmicas que se refletiram nos resultados do hemograma.

Tabela 2. Valores médios \pm desvio padrão referentes ao hemograma dos animais experimentais tratados via intravaginal e respectivos controles, aferidas ao final do experimento.

Parâmetros avaliados	T1	T2	T3	T4
Eosinófilos (mm^3)	97,3 \pm 36,45	35,8 \pm 33	17 \pm 38,7	0
Monócitos (mm^3)	0	10,1 \pm 5,26	0	0
Linfócitos (mm^3)	2781 \pm 188,7	3093,6 \pm 151	3118 \pm 624	2028 \pm 207,6
Bastonetes (mm^3)	0	0	0	0
Segmentados (mm^3)	1361 \pm 299	885,1 \pm 270,8	1473 \pm 317	1572 \pm 212
Leucócitos Totais (mm^3)	4239 \pm 478	4024,6 \pm 215	4598 \pm 468	3600 \pm 110

ERITRÓCITOS (x 10 μ 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. A 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).

4. 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.

5. 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 reccurent vulvovaginal candidiasis. **Am J Obstet Gynecol.**; 1985; 157 (7): 924-934.

Val, I.C.C.; Almeida F^o., G.L. Abordagem Atual da Candidíase Vulvaginal. **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.