



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS DE
Origanum vulgare L. E *Thymus vulgaris* FRENTE A MICRORGANISMOS
DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA**

LUCIANA DE SOUZA PRESTES

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas,
sob a orientação do Prof. Mario
Carlos Araújo Meireles, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Veterinária,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências (M.S.).

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Abril de 2006



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM VETERINÁRIA**

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS DE
Origanum vulgare L. E *Thymus vulgaris* FRENTE A MICRORGANISMOS
DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA.**

LUCIANA DE SOUZA PRESTES

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas,
sob a orientação do Prof. Mario
Carlos Araújo Meireles, como parte
das exigências do Programa de
Pós-Graduação em Veterinária,
para obtenção do Título de Mestre
em Ciências (M.S.).

PELOTAS
Rio Grande do Sul - Brasil
Abril de 2006

LUCIANA DE SOUZA PRESTES

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS DE *Origanum vulgare* L. E *Thymus vulgaris* FRENTE A MICRORGANISMOS DE IMPORTÂNCIA VETERINÁRIA.

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Pelotas, sob a
orientação do Prof. Mario Carlos Araújo
Meireles, como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Veterinária, Área de Concentração:
Sanidade Animal, para obtenção do
título de Mestre em Ciências.

APROVADA:

Profa.Dra. Marcia de Oliveira Nobre

Prof. Dr. João Luiz Zani

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini

Prof. Dr. Mario Carlos Araújo Meireles
(Orientador)

“O que a lagarta chama de fim do mundo o
mestre chama de borboleta.”

Richard Bach.

Aos meus pais

Aos meus irmãos

Aos meus amigos

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Pelotas e à Faculdade de Veterinária pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), que cedeu as cepas de referência.

À Quimer Comercial Ltda representada por Fitotemp - Chá e temperos que doou o orégano.

À Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre (COPAVA) que fez a doação do tomilho.

Ao Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles que além de orientador foi um amigo durante a execução do trabalho e minha adaptação à esta nova etapa de minha vida.

Ao Prof. Luiz Filipe Damé Schuch, meu co-orientador, que soube sempre passar seus conhecimentos com muita generosidade e muita paciência.

À Profa. Dra. Maria Regina Alves Rodrigues, minha co-orientadora que colaborou com seus conhecimentos na área de fitoquímica.

Ao Prof. Dr. João Luiz Zani que além de sua amizade, contribuiu com seus conhecimentos e sugestões para a realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Leila Macias por sua amizade e conhecimentos de botânica.

Às queridas amigas Sílvia Ladeira, Renata Schramm e Carla Hartwig que além de sua amizade, sempre foram solidárias em todos os momentos.

Às colegas do laboratório de Micologia, que sempre foram muito prestativas e me auxiliaram sempre com minhas dúvidas.

Aos funcionários e estagiários dos laboratórios de Micologia, Bacteriologia e Fitoquímica pela sua colaboração.

Aos funcionários da Faculdade de Veterinária que sempre colaboraram cada um da sua forma e que me receberam com carinho e amizade.

Aos meus pais Clóvis e Dirlei que não mediram esforços e muitos sacrifícios fizeram para que eu alcançasse meus objetivos.

Aos amigos e amigas que fazem parte de minha vida e espero que sempre estejam comigo, mesmo os que estão longe, mas perto em pensamento.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

INDICE

SUMÁRIO.....	vii
SUMMARY.....	vii
1.INTRODUÇÃO GERAL.....	07
2.METODOLOGIA GERAL.....	08
3.AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Origanum vulgare</i> L. E <i>Thymus vulgaris</i> FRENTE A DERMATÓFITOS.....	11
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	12
INTRODUÇÃO.....	13
MATERIAL E MÉTODOS.....	14
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	16
CONCLUSÃO.....	20
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	21
4.AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS DE <i>Origanum vulgare</i> L.E <i>Thymus vulgaris</i> L. FRENTE A MICRORGANISMOS ENVOLVIDOS EM OTITE EXTERNA.....	24
RESUMO.....	24
ABSTRACT.....	25
INTRODUÇÃO.....	26
MATERIAL E MÉTODOS.....	27
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	32
5.CONCLUSÕES GERAIS.....	34
6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	35
ANEXO 1. Laudo da planta <i>Origanum vulgare</i> de origem comercial.....	41
ANEXO 2. Ficha de identificação da ATCC 14683 (<i>M. gypseum</i>).....	42
ANEXO 3. Ficha de identificação da ATCC 9533 (<i>T. mentagrophytes</i>).....	43
ANEXO 4. Ficha de identificação da ATCC 32903 (<i>M. canis</i>).....	44
ANEXO 5. Ficha de identificação da ATCC 10145 (<i>P. aeruginosa</i>).....	45
ANEXO 6. Ficha de identificação da ATCC 12600 (<i>S. aureus</i>).....	46

SUMARIO

A agroecologia tem como um de seus objetivos validar os conhecimentos de diversas comunidades na utilização de medicamentos elaborados a partir de plantas medicinais, principalmente em países em desenvolvimento, que necessitam de alternativas economicamente viáveis visando o bem estar animal. Com base nestes objetivos foi realizado o estudo da atividade do *Origanum vulgare* L. e de *Thymus vulgaris* L., plantas que são utilizadas tradicionalmente como tempero, através de três formas de extração diferentes por arraste de vapor, maceração e decocção. Foram realizados testes *in vitro* de óleo essencial, tintura e decocto, frente a microrganismos relacionados a duas enfermidades as dermatofitoses e a otite externa. Dentro destas enfermidades foram selecionadas três espécies fúngicas que causam dermatofitoses (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum gypseum*) uma levedura, a *Malassezia pachydermatis*, e duas bactérias (*Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*) envolvidas nas otites externas em cães para serem avaliados frente aos diferentes extratos das plantas. Foi utilizado o método de microdiluição em caldo e os resultados foram expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM-µl/ml) Os óleos essenciais foram extraídos através do aparelho Clevenger modificado e as amostras foram submetidas à análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) para caracterização de seus principais constituintes conhecidos como timol e o carvacrol. Os óleos essenciais apresentaram CIM mais baixo (1%), no entanto, as tinturas apresentaram um rendimento melhor por quantidade de planta e extrato obtido. Os extratos que apresentaram melhores resultados foram da planta *Origanum vulgare* L.

SUMARY

The ethnoveterinary has as one of their objectives to validate the several communities' knowledge in the use of medicines elaborated starting from medicinal plants, mainly in developing countries, that need alternatives economically viable seeking the good to be animal. With base in these objectives the study of the activity of the *Origanum vulgare* L. was accomplished and of *Thymus vulgaris* L., plants that you/they are used traditionally as seasoning, through three forms of different extraction for it drags of steam, maceration and decoction. Tests in vitro of essential oil, dye and aqueous extract were accomplished, front to microorganisms related to two illnesses the dermatofitosis and the external otitis. Inside of these illnesses they were selected three fungus that cause dermatofitosis (*Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Microsporum gypseum*) a yeast, the *Malassezia pachydermatis*, and two bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*) involved in the external otitis in dogs for us to be appraised front to the different extracts of the plants. The both microdilution method was used in broth and the results were expressed in Minimal Inhibitory Concentrations (MIC- μ l/ml) The essential oils were extracted through the modified Clevenger apparatus and the samples were submitted to the analysis by Gaseous Chromatography coupled to the Espectrometry of Masses (GC/EM) for their main known representatives' characterization as timol and the carvacrol. The essential oils presented lower MIC (1%), however, the methanol extract presented a better income for amount of plant and obtained extract. The extracts that presented better results were of the plant *Origanum vulgare* L.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades acompanha a história da humanidade. Os primeiros povos que escreveram obras sobre medicina e plantas medicinais foram os chineses e egípcios. Hipócrates utilizou e catalogou centenas de drogas de origem vegetal. Em países do terceiro mundo, incluindo o Brasil, onde 70-80% da população não tem assistência farmacêutica, as plantas medicinais são utilizadas como alternativa terapêutica (SIMÕES, 2004).

O crescimento do mercado de medicamentos fitoterápicos no Brasil é de 15% ao ano, já o mercado de medicamentos sintéticos é de 3-4%, sendo que apenas 20% da população consomem 63% dos medicamentos sintéticos e o restante da população utiliza os produtos de origem vegetal como recurso terapêutico (SIMÕES, 2004).

As plantas aromáticas utilizadas popularmente como condimento na culinária têm sido também muito estudadas no sentido de comprovação do seu uso terapêutico. Duas destas plantas, *Origanum vulgare* L. ("orégano") e *Thymus vulgaris* L. ("tomilho"), tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores. A potente ação antibacteriana e antioxidante desses óleos tem sido amplamente demonstrada (STRYCHARZ, SHETTY, 2002; BERTELLI *et al.*, 2003, BURT, REINDERS, 2003).

A planta *Origanum vulgare* Linneus (GARCIA *et. al.*, 2001; MOCKUTE *et.al.*, 2003), é uma planta perene que se adapta a solos secos e calcários (KEN, 1951). Seu caule é ereto, geralmente com uma coloração vermelho pardo, quadrangular, piloso, ramificando-se nas extremidades superiores, formando touceiras. Suas folhas são pecioladas, inteiras, verde-escuras ou ligeiramente acinzentadas, apresentam pêlos finos e curtos na face inferior de cada folha. As flores apresentam diversas cores como vermelhas, púrpuras e rosadas (QUER, 1988).

O *Thymus vulgaris* L. é uma planta distribuída em áreas no mediterrâneo e Ásia, assim como o orégano pertence à família das Lamiáceas (BADI *et al*, 2004). A planta tem haste lenhosa na base e

herbácea na ponta, cujos ramos são eretos, aveludados e de cor branca, folhas verde-acinzentadas e pontilhadas na face superior e flores róseas ou brancas. O óleo essencial desta espécie contém timol, carvacrol, cimol, borneol, linalol, cimeno e pineno, além de taninos (MAFIA, *et al*, 2005).

A otite externa em pequenos animais é a doença mais comum diagnosticada em cães e, portanto é marcante a sua importância na clínica. A *Malassezia pachydermatis* é uma levedura encontrada em otite externa como agente perpetuante, facilitada pela utilização excessiva de antibacterianos que eliminam bactérias comensais competidoras. Segundo Eichenberg (2003), a resistência às drogas antifúngicas se deve ao uso indiscriminado destes medicamentos e ainda destaca a necessidade de estudos sobre a suscetibilidade da *M. pachydermatis* frente às drogas existentes no mercado. Outra enfermidade comum na clínica é a dermatofitose.

A dermatofitose é uma micose superficial causada por fungos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. São fungos filamentosos, hialinos, septados, queratinofílicos capazes de colonizar e causar lesões clínicas, no extrato córneo em animais e no homem (LACAZ, 1988; SUMMERBELL, 2000; ARRUDA, 2001; SIDRIM, 2004). As drogas usadas atualmente podem causar efeitos secundários como vômitos, alterações nas funções hepáticas e gastrintestinais em humanos (PALACIO *et. al*, 2002). O objetivo do presente trabalho é comprovar a atividade antifúngica e antibacteriana *in vitro* de extratos das folhas das plantas *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* L. frente a microrganismos que causam dermatofitoses em animais domésticos e humanos e otite externa em pequenos animais.

2. METODOLOGIA GERAL

Para a realização deste trabalho foram utilizados três métodos de extração de duas plantas com o intuito de comprovar sua atividade antimicrobiana através de Microdiluição em Caldo, avaliadas pela sua Concentração Inibitória Mínima (CIM). As plantas utilizadas foram o *Origanum vulgare* L. e o *Thymus vulgaris* L. conhecidos como “orégano” e “tomilho”, respectivamente. Com as duas plantas foram preparadas as mesmas formas de extração, um extrato oleoso preparado utilizando-se o aparelho Clevenger (Farmacopéia Brasileira, 1988) modificado. Com este processo conseguimos obter a partir de 100 g de cada planta um volume de 1,7ml de óleo.

Uma tintura através do processo de maceração em álcool a 70°GL durante 15 dias sofrendo agitação diariamente. O volume de planta utilizado foi de uma parte pra dez partes do solvente, utilizamos 50g de planta para 500ml de álcool de cereais, terminados os cinco dias de extração, o extrato foi filtrado e repostado o seu volume original com o álcool. Após para a retirada do álcool foi utilizado um evaporador rotativo a 55°C sob 600 mm/hg de pressão negativa, para o teste de microdiluição em caldo. O decocto foi preparado através da ebulição da planta (2g) em água destilada (20ml) por 10 minutos. Os fungos foram cultivados em meio Mycosel® (DIFCO) e os inoculos preparados conforme a escala 0,5 de MacFarland em solução salina 0,9% com Tween 20(NCCLS, 1997). As bactérias foram cultivadas em agar-sangue e seu inoculo preparado em BHI a temperatura de 37°C, após foram realizadas diluições em BHI 2X.

Para determinar a sensibilidade das cepas frente aos extratos de *O. vulgare* L. e *T. vulgaris*, foi utilizado o método de Microdiluição em Caldo (NCCLS, 1997) modificado por Nascente (2001), com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos das amostras de orégano e tomilho (LAMBERT, *et. al.*, 2001; MANOHAR, *et. al.*, 2001).

Os extratos foram diluídos em base logarítmica dois em água destilada estéril e agitados, tantas diluições quanto o suficiente para detecção da CIM. 100 µl de cada diluição do extrato e de inoculo foram adicionados a uma microplaca de 96 orifícios, as placas foram, então, incubadas a

temperatura de 25°C por até 10 dias, para os dermatófitos e temperatura de 37°C por 48hs para as bactérias e 37°C por 72hs para os isolados de *Malassezia pachydermatis*. Controles positivos e negativos contendo meio de cultura e microrganismo e meio de cultura e extrato, foram mantidos. O crescimento microbiano foi verificado por turvação em contraste com os controles, e a CIM foi estabelecida pela recíproca da diluição dos extratos onde não houve turvação visível, realizando-se média entre as duas repetições (LAMBERT, *et. al.*, 2001; MANOHAR, *et. al.*, 2001).

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS DE *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* L. FRENTE À DERMATÓFITOS.

**PRESTES, L. S.¹; FRASCOLLA, R.; SANTIN, R.² SANTOS, M.A.Z.³; SCHRAM, R.C.⁴;
RODRIGUES, M.R.A.⁵; SCHUCH, L.F.D.⁶; MEIRELES, M.C.A.⁷**

¹Mestranda do PPG em veterinária – Fvet/UFPeI (lprestes_mv@hotmail.com)

²Estagiária de iniciação científica – LDI – DVP/FVet/UFPeI

³Laboratório de Química Orgânica – DQO/IQG/UFPeI

⁴Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) - DVP/FVet/UFPeI

⁵Laboratório de Química Orgânica – DQO/IQG/UFPeI

⁶Laboratório de Doenças Infecciosa – DVP/FVet/UFPeI

⁷Laboratório de Doenças Infecciosa – DVP/FVet/UFPeI, Campus universitário s/n, CEP 96010900.

Resumo

A validação de plantas como medicinais permite a sua utilização segura e efetiva. As dermatofitoses afetam várias espécies de animais domésticos e o homem. Este trabalho teve por objetivo avaliar o efeito antimicrobiano de diferentes extratos de *Origanum vulgare* L. (orégano) e de *Thymus vulgaris* L. (tomilho), frente a amostras de *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Microsporum gypseum* através do teste de microdiluição em caldo. Foram preparados para a avaliação do efeito antimicrobiano as extrações das duas plantas. A CIM média dos óleos essenciais de *T. vulgaris* (0,88%) e *O. vulgare* (0,96%) foram mais baixas que aquelas obtidas para as tinturas (20,83% e 6,83%, respectivamente), embora tenham sido estatisticamente significativas somente para o *T. vulgaris*. Os decoctos tiveram fraco efeito antimicrobiano ($p < 0,0001$), com aquele do *O. vulgare* (57,25%) apresentando efeito superior ($p = 0,0027$) ao do *T. vulgaris* (81,25%). Concluiu-se que todos os extratos testados destas plantas atuam sobre os microrganismos testados. Os óleos essenciais apresentaram-se mais eficazes, porém com rendimento menor por grama de planta do que as tinturas.

Palavras chave: orégano, tomilho, dermatófitos, antimicrobiano, antifúngico.

ABSTRACT

The validation of medicinal plants allows her use holds and it executes. The dermatofitosis affect several species of domestic animals and the man. This work had for objective to evaluate the effect antimicrobial of different extracts of *Origanum vulgare* L. (oregano) and of *Thymus vulgaris* L. (thyme), front to samples of *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Microsporum gypseum* through the broth microdilution assay. They were prepared for the evaluation of the effect antimicrobial an essential oil, a dye and a aqueous extracts of the two plants. Medium MIC of the essential oils of *T. vulgaris* (0,88%) and *O. vulgare* (0,96%) they were lower than those obtained for the dyes (20,83% and 6,83%, respectively), although they have been significant estatistically only for the *T. vulgaris*. The aqueous extract had weak effect antimicrobial ($p < 0,0001$), with that of the *O. vulgare* (57,25%) presenting superior effect ($p=0,0027$) to the of the *T. vulgaris* (81,25%). it was ended that all of the tested extracts of these plants act on the tested microorganisms. The essential oils came more effective, however with smaller income for gram of plant than the methanol extracts.

Words key: oregano, thyme, dermatophytes, methanol extract, essential oil.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas como medicinais se iniciou a partir do momento em que o homem primitivo começou a utilizar os vegetais para sua nutrição. Foram encontrados indícios do uso empírico de plantas medicinais e tóxicas nas civilizações primitivas. No entanto o uso popular das plantas como medicamento não é suficiente para atestar a sua indicação, sendo necessária a validação desta terapêutica de forma que sua utilização possa ser segura e eficiente, para tal devem ser realizados estudos que comprovem sua ação e toxicidade (Simões, *et al*, 2004).

As plantas aromáticas utilizadas popularmente como condimento na culinária têm sido também muito estudadas quanto a sua aplicação. Duas destas plantas, *Origanum vulgare* L (“orégano”) e *Thymus vulgaris* (“tomilho”), tem sido objeto de estudo de vários pesquisadores. A potente ação antibacteriana e antioxidante desses óleos tem sido amplamente demonstrada (Strycharz, Shetty, 2002; Bertelli *et al.*, 2003, Burt, Reinders, 2003;).

Os microrganismos testados foram escolhidos por causarem enfermidades relatadas como freqüentes na clínica, tanto na veterinária quanto na medicina humana (Sidrim, *et. al.*, 2004; Balda, *et. al.*, 2004,).

Este trabalho teve como objetivo principal, avaliar a presença de componentes químicos dos óleos essências e a atividade antimicrobiana dos extratos do orégano e tomilho, frente aos dermatófitos, *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum* e *Trichophyton mentagrophytes*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem das plantas

As folhas da planta *O. vulgare* L. foram obtidas de fonte comercial (Quimer Ltda.), já previamente seca e com respectivo laudo agrônomo e botânico (Anexo 1). *T. vulgaris* L. foi coletado de horta de plantas medicinais, em assentamento da reforma agrária (Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre), Município de Piratini (4587E, 6070N). As suas folhas foram secas ao ar livre, protegidas do sol e da chuva. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas e identificada pela Dra. Leila Macias.

Extração do óleo

A extração dos óleos do *O. vulgare* e do *T. vulgaris* foi feita por arraste de vapor com Clevenger (Farmacopéia Brasileira, 1988) modificado. O material a ser extraído foi colocado em um balão de vidro, com água destilada estéril na proporção de 100g de planta para 500ml de água destilada estéril, e através da ebulição, uma corrente de vapor de água arrasta o óleo. A mistura de vapores é conduzida a um condensador onde são recolhidos em um separador. O óleo foi recuperado por decantação e após, seco com Na₂SO₄ anidro e concentrado sob nitrogênio (Craveiro, *et. al.*, 1981).

Cromatografia

A análise cromatográfica foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM). realizada no laboratório de fitoquímica, no Instituto de Química orgânica da Universidade Federal de Pelotas. Foi injetado no cromatógrafo (GC/FID Shimadzu Mod. 17 A, coluna capilar com 5% diphenil/95% dimethylsiloxane) 1µl da amostra de óleo das plantas no cromatógrafo, com objetivo de caracterizar e comparar os constituintes principais timol e carvacrol das duas plantas.

Preparação das tinturas

Tinturas das plantas foram preparadas utilizando-se uma parte das plantas secas para dez partes de álcool de cereais a 70° GL. As plantas

permaneceram em maceração por 15 dias e os frascos foram agitados três vezes por dia durante este período (Farmacopéia Brasileira, 1988), quando foi filtrado, reposto o volume com o álcool e armazenado em frasco âmbar até o seu uso. Após, o álcool foi retirado da tintura para o teste *in vitro* utilizando-se evaporador rotativo a 55°C sob 600 mm/hg de pressão negativa. Após a retirada do álcool o volume inicial foi restituído com água destilada estéril.

Preparação dos decoctos

Os decoctos foram preparados utilizando-se uma parte da planta para dez de água destilada estéril mantida em ebulição por 10 minutos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Foram preparados momentos antes de sua utilização devido à possibilidade de degradação do extrato (Simões, 2004).

Dermatófitos

Utilizou-se três espécies de dermatófitos - *Microsporum canis* (ATCC 32903), *Trichophyton mentagrophytes* (ATCC 9533) e *Microsporum gypseum* (ATCC 14683) - gentilmente cedidos pela Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Os isolados de campo foram obtidos de casos clínicos de dermatofitose em cão (*M. canis*), chinchila (*T. mentagrophytes*) e o *M. gypseum* foi isolado do solo através da técnica de isca (Lacaz, 1998).

Concentração Inibitória Mínima:

Para determinar a sensibilidade das cepas frente aos extratos de *O. vulgare* L. e *T. vulgaris* L., foi utilizado o método de Microdiluição em Caldo (NCCLS, 1997) modificado por Nascente (2001), com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos das amostras de orégano e tomilho (Lambert, *et. al.*, 2001; Manohar, *et. al.*, 2001). Os microrganismos foram ativados através do cultivo prévio em meio Mycosel® e o inóculo preparado por diluição em meio de cultura Sabouraud líquido, à concentração de 10³UFC/mL. Os extratos foram diluídos em base logarítmica dois em água destilada estéril e agitados, tantas diluições quanto o suficiente para detecção da CIM. 100 µl de cada diluição do extrato e de inóculo foram adicionados a uma microplaca de 96 orifícios, as placas foram, então, incubadas a temperatura de 25°C por até 10 dias. Controles positivos e negativos contendo

meio de cultura e microrganismo e meio de cultura e extrato, foram mantidos. O crescimento microbiano foi observado através da verificação do crescimento de colônias fúngicas em contraste com os controles, e a CIM foi estabelecida pela recíproca da diluição dos extratos onde não houve turvação visível nas duas repetições (Lambert, *et. al.*, 2001; Manohar, *et. al.*, 2001).

Análise estatística

Para comparação do efeito dos diferentes extratos de cada planta, foi realizada a análise de variância e teste de Tukey para comparação entre médias. A comparação dos tipos de extratos entre as plantas, realizou-se o pareamento entre as amostras e teste T para comparação entre pares. Todas as análises foram realizadas com o programa Statistix 8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cromatografia mostrou diferenças dos constituintes entre as plantas. O óleo de *Thymus vulgaris* apresentou sete picos compatíveis com os padrões utilizados (Mirceno, p-cimeno, 1,8 cineol, linalol, 4-terpineol, α -Terpineol e timol). Pelo menos outros 17 constituintes foram observados, muitos deles em quantidades maiores que o teor de timol. A quantidade de carvacrol cujo pico aparece muito sutil no cromatograma, indicando uma quantidade muito baixa deste constituinte. Daferera et al. (2000) identificou alto teor de Timol (63%) em tomilho de origem grega.

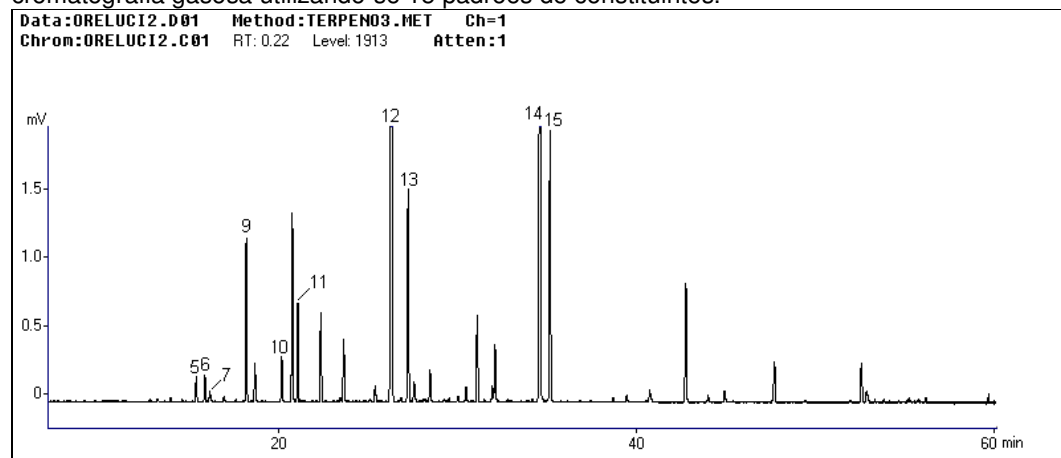
O óleo de *T. vulgaris* L. apresentou uma quantidade grande de constituintes, que não estavam incluídos nos padrões utilizados na análise (Tabela 1). Dos constituintes caracterizados observou-se razão alta entre as concentrações de timol e carvacrol, cujo pico aparece muito sutil no cromatograma por sua quantidade ser muito baixa não foi destacado no cromatograma (Figuras 1 e 2). Vários fatores influenciam na composição dos óleos como fotoperíodo, altitude, temperatura do ar e disponibilidade de água. Esses fatores podem causar mudanças nas plantas não só na morfologia e anatomia como, mas também em sua fisiologia e produtividade (KOFIDIS, *et. al.*, 2003).

Tabela 1: Relação de padrões utilizados na análise cromatográfica injetados numa concentração de 40 ppm. **Padrão 15 AM** (união dos 15 padrões)

Nº	Composto	Tempo de retenção	Fórmula Molecular	Peso Molecular
1	α -pineno	10,44	$C_{10}H_{16}$	136
2	Canfeno	11,18	$C_{10}H_{16}$	136
3	β -pineno	12,76	$C_{10}H_{16}$	136
4	Mirceno	13,83	$C_{10}H_{16}$	136
5	α -terpineno	15,28	$C_{10}H_{16}$	136
6	p-cimeno	15,76	$C_{10}H_{14}$	134
7	Limoneno	16,05	$C_{10}H_{16}$	136
8	1,8-cineol	16,14		
9	γ -terpineno	18,08	$C_{10}H_{16}$	136
10	terpinoleno	20,06	$C_{10}H_{16}$	136
11	Linalol	20,96	$C_{10}H_{18}O$	154
12	4-terpineol	26,15	$C_{10}H_{18}O$	154
13	α -terpineol	27,12	$C_{10}H_{18}O$	154
14	Timol	34,48	$C_{10}H_{14}O$	150
15	Carvacrol	35,06	$C_{10}H_{14}O$	150

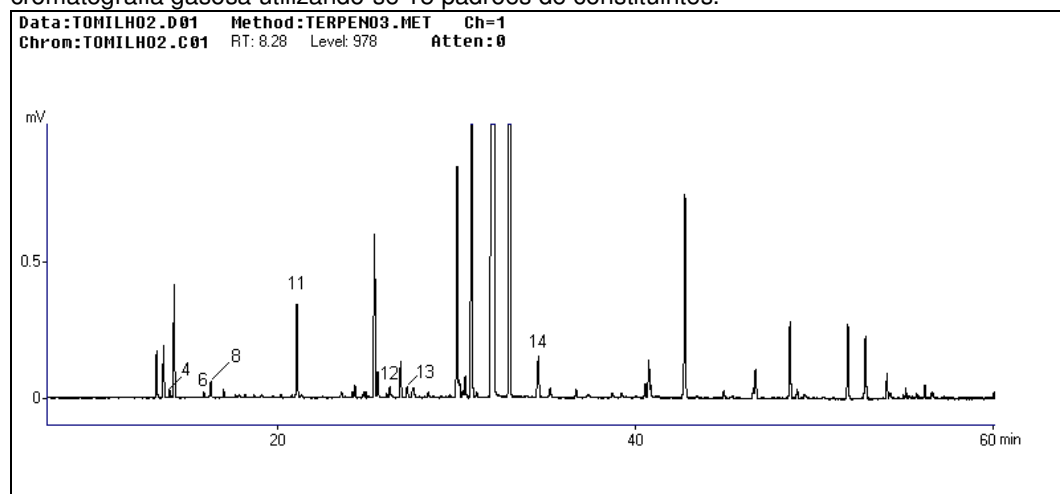
Condições do CG /FID : Método Terpeno3: 40°C – 2°C/min – 145°C – 10°C/min – 280 °C (10min) Td= 280°C Tinj= 280°C Tcol= 40°C split 1/50

Figura 1: Cromatograma do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. Análise foi realizada por cromatografia gasosa utilizando-se 15 padrões de constituintes.



Relação de padrões injetados numa concentração de 40 ppm. **Padrão 15 AM** (união dos 15 padrões)- 1- α -pineno; 2-Canfeno; 3- β -pineno; 4-Mirceno; 5- α -terpineno; 6-p-cimeno; 7-Limoneno; 8-1,8-cineol; 9- γ -terpineno; 10-Terpinoleno; 11-Linalol; 12-4-terpineol; 13- α -terpineol; 14-Timol; 15-Carvacrol

Figura 2: Cromatograma do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L. Análise realizada por cromatografia gasosa utilizando-se 15 padrões de constituintes.



Relação de padrões injetados numa concentração de 40 ppm. **Padrão 15 AM** (união dos 15 padrões)- 1- α -pineno; 2-Canfeno; 3- β -pineno; 4-Mirceno; 5- α -terpineno; 6-p-cimeno; 7-Limoneno; 8-1,8-cineol; 9- γ -terpineno; 10-Terpinoleno; 11-Linalol; 12-4-terpineol; 13- α -terpineol; 14-Timol; 15-Carvacrol

Quanto ao *O. vulgare* L., puderam ser identificados 10 constituintes relacionados aos padrões (α -terpineno, p-cimeno, limoneno, γ -terpineno, terpinoleno, linalol, 4-terpineol, α -Terpineol, timol e carvacrol), sendo a relação timol x carvacrol próxima a 1:1. Ainda, o pico de 4-terpineol apresentou-se muito semelhante ao dos constituintes principais, indicando alto teor deste constituinte.

Diversos autores tem descrito a análise cromatográfica de óleo de orégano. Segundo Simões (2004), dentre os compostos presentes no óleo essencial de orégano, encontramos pineno, terpineno, canfeno, linalol, terpineol, terpineol-4, cis-sabineno hidratado, carvacrol, timol, acetato de linalila, acetato de cis-sabineno hidratado, germacreno, cariofileno e espatulenol, sendo que dentre estes, podemos destacar como princípios ativos mais abundantes o carvacrol e o timol (SKOULA, M., *et. al.*, 1999, LAMBERT, R.J.W., 2001).

Rodrigues et al. (2004), identificaram uma proporção muito superior de timol do que carvacrol em *O. vulgare* L. cultivado na região sul do Rio Grande do Sul. Também, nessa amostra pode ser identificada grande quantidade de hidrato de cis-sabineno (pico de amplitude semelhante ao do timol).

A variação na constituição do óleo essencial do *O. vulgare* L. tem levado a tentativa de classificar a planta em diferentes quimiotipos de acordo com o

principal constituinte (SKOULA, et. al., 1999). Esta variação é dependente da variedade do orégano, da altitude, sazonalidade e outras características agronômicas (Mockute et al., 2003; Kofidis et al., 2003).

As CIM para os diferentes extratos frente aos microrganismos testados é apresentada na Tabela 2. Apesar dos constituintes das duas plantas serem diferentes, a CIM dos óleos foi próxima a 1% tanto para as cepas de referência como para os isolados de campo. Shin e Lin (2004) encontraram a mesma CIM de 1%, do óleo de *T. vulgaris* L. frente ao *T. mentagrophytes* e 0,5% utilizando para este fungo somente o timol. Sökmen (2004) testou o óleo essencial de *Origanum acutiens* frente a *M. canis* e *T. mentagrophytes* através do método de microdiluição em disco e obteve respectivamente 32 mm halo de inibição e não obteve inibição do *T. mentagrophytes*. O baixo teor de timol e carvacrol do óleo essencial de *T. vulgaris* L. sugere que existam outros constituintes com ação antifúngica.

TABELA 2: Concentração Inibitória Mínima* dos diferentes extratos de *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* L. frente aos dermatófitos .

Identificação dos isolados		<i>Origanum vulgare</i> L.			<i>Thymus vulgaris</i> L.		
		Óleo (%) b,x**	Tintura (%) b,x	Decocto (%) a,x	Óleo (%) c,x	Tintura (%) b,y	Decocto (%) a,y
<i>Microsporum gypseum</i>	ATCC 14683	1	6,25	37,5	1	3,67	75
	solo	1	2,13	37,5	0,75	37,5	75
<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	ATCC 9533	1	12,5	100	1	25	100
	chinchila	1	12,5	75	1	25	100
<i>Microsporum canis</i>	ATCC 32903	0,75	3,17	18,75	0,5	9,37	37,5
	cão	1	6,25	75	1	25	100

100=sem inibição

* CIM expresso em concentração de extrato (v/v).

** Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o CIM médio dos extratos, quando comparados diferentes extratos de cada planta (a, b e c) e o mesmo tipo de extrato entre as duas plantas (x,y).

As tinturas apresentaram CIM mais elevada do que o óleo essencial. No entanto, diferenças significativas entre estes extratos foram detectadas somente nos extratos de *T. vulgaris* L. A tintura de “orégano” foi mais eficaz que a de “tomilho”.

Outro aspecto a ressaltar é a relação quantidade de planta utilizada para preparação do extrato e CIM obtido. Na obtenção do óleo

essencial, utilizou-se 100 g das plantas para obter 1,7 ml de óleo essencial, enquanto que na preparação da tintura, com 10 g se obtém a mesma quantidade de extrato. Ao relacionarmos com o CIM desses extratos, indica que o rendimento de 1 g de planta preparada pelo método da tintura apresenta maior efeito antifúngico do que uma grama submetida a extração de óleo essencial.

Os decoctos das plantas apresentaram-se menos eficazes, com CIM variando de 25% a 18,75% nenhuma inibição do crescimento dos microrganismos. O decocto de orégano não foi eficaz frente ao isolado de *T. mentagrophytes* e o de tomilho frente a *M. gypseum* de referência, os dois *T. mentagrophytes* e ao isolado de *M. canis*.

CONCLUSÃO

Todos os extratos inibiram o crescimento dos fungos com diferentes CIM, o extrato oleoso obteve o melhor resultado, porém o rendimento obtido por esta forma farmacêutica é bem menor por grama de planta com relação aos outras formas de extração. Serão necessárias análises dos outros tipos de extratos para comparação entre eles dos constituintes extraídos em cada forma de extração.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARRUDA, M.S.P.; GILIOLI, S.; VILANI-MORENO, F.R. Experimental Dermatophytosis in hamsters inoculated with *Trichophyton mentagrophytes* in the cheek pouch. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** v.43 (1), 29-32, 2001.

BALDA, A.C.; LARSSON, C.E.; OTSUKA, M.; GAMBALE, W. Estudo retrospectivo de causuísticas 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.

BERTELLI, D.; PLESSI, M.; MIGLIETA, F.; Effect of microwaves on volatile compounds in origanum – **Swiss Society of Food Science and Technology**, v.36:555-560 (2003).

BONALDO, S.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., TESSMANN, D.J. & SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29:128-134. 2004.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of select plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, 162-167, 2003.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza-CE.ed.UFC, 1981.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. GC-MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 48, 2576-2581, 2000.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, ed. Atheneu (S. Paulo), 4^o ed., v.1, 1988.

KOFIDIS, G.; BOSABALIDIS, A.M.; MOUSTAKAS, M. Contemporary Seasonal and Altitudinal Variations of Leaf Structural Features in Oregano (*Origanum vulgare* L.) **Annals of Botany**. 92: 635-645, 2003.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARI, E.M.; MELO, N.T. Identificação dos fungos. In: **Fungos Actinomicetos e Algas de interesse médico**, ed. Savier, São Paulo (Brasil), 1998, p.130.

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. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, 453-462, 2001.

MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., VENTURA, G.M., FERREIRA, E.M., NEVES, I.F., VANETTI, C.A. & SILVA, C. Queima foliar e tombamento de mudas em plantas medicinais causadas por *Rhizoctonia solani* AG1 - 1B. **Fitopatologia Brasileira** 30:302-306. 2005.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Cândida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry** 228, 111-117, 2001.

MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* growing wild in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p.269-278, 2003.

NASCENTE, P.S. ***Malassezia pachydermatis* em cães e gatos: estudo da frequência e avaliação da sensibilidade aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol**. Pelotas-RS, 2001, 84p. Dissertação de Mestrado em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, 2001.

NCCLS – **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard. M27 – A, 17, n.9, 1997.

PINHEIRO, A.D.; MOREIRA, J.L.B.; SIDRIM, J.J.C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 30 (4): 287-294, jul-ago, 1997.

RODRIGUES, M. R. A.; KRAUSE, C. L.; 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.** 54, 3042-3047, 2004.

SCHIMITT, A.C.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SILVEIRA, T.A.; IWAKURA, C.T.; MENDES, K.F. & SILVA, M.C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz (folha-da-fortuna) colhida em Várzea Grande, Mato Grosso/Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. 31(1): 55-58, 2003.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 2004, p.388.

SKOULA, M.; GOTSIOU, P.; NAXAKIS, G.; JOHNSON, C.B. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). **Phytochemistry** 52, 649-657, 1999.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Ed. da UFRGS/ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis, SC, 2004, p.1002.

SÖKMEN, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; GULLUCE, M.; POLISSOU, M.; In Vitro Activity Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and Callus Cultures of *Origanum acutiens*. **J. Agric. Food Chem.** 52, 3309-3312, 2004.

STRYCHARZ, S.; SHETTY, K. Response of oregano (*Origanum vulgare* L.) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polyde R-478 and implications for hyperhydricity prevention in tissue culture. **Process Biochemistry** 38, 343-350, 2002.

SUMMERBELL, R.C. Form and function in the evolution of dermatophytes. **Revista Iberoamericana de Micologia** 64, 168-204, 2000.

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE DE DIFERENTES EXTRATOS DE
Origanum vulgare L.E *Thymus vulgaris* FRENTE A MICRORGANISMOS
ENVOLVIDOS EM OTITE EXTERNA**

**PRESTES, L. S.¹; FRASCOLLA, R.; SANTIN, R.² SANTOS, M.A.Z.³;
SCHRAM, R.C.⁴; RODRIGUES, M.R.A.⁵; SCHUCH, L.F.D.⁶; MEIRELES,
M.C.A.⁷**

¹Mestranda do PPG em veterinária – Fvet/UFPeI lprestes_mv@hotmail.com

²Estagiária de iniciação científica – LDI – DVP/FVet/UFPeI

³Laboratório de Química Orgânica – DQO/IQG/UFPeI

⁴Laboratório de Doenças Infecciosas (LDI) - DVP/FVet/UFPeI

⁵Laboratório de Química Orgânica – DQO/IQG/UFPeI

⁶Laboratório de Doenças Infecciosa – DVP/FVet/UFPeI

⁷Laboratório de Doenças Infecciosa – DVP/FVet/UFPeI, Campus universitário s/n, CEP
96010900.

Resumo

O uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades acompanha a história da humanidade. Os primeiros povos que escreveram obras sobre medicina e plantas medicinais foram os chineses e egípcios. Hipócrates utilizou e catalogou centenas de drogas de origem vegetal. A otite externa em pequenos animais é a doença mais comum diagnosticada em cães e, portanto é marcante a sua importância na clínica. O objetivo deste trabalho foi apresentar uma possível alternativa de tratamento para a otite externa através da avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de três tipos de extratos das plantas *Origanum vulgare* L. (orégano) e de *Thymus vulgaris* (tomilho), um extrato oleoso, uma tintura e um decoto. Os extratos foram testados através de microdiluição em caldo frente a isolados de *Malassezia pachydermatis*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600). Foi realizada análise cromatográfica dos óleos, para comparação dos seus constituintes. Os extratos oleosos apresentaram CIM mais baixa frente os microrganismos, no entanto, os extratos com melhor rendimento foram as tinturas.

Palavras chaves: *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, extratos, cromatografia, otite externa.

ABSTRACT

The use of medicinal plants in the treatment of illnesses accompanies the humanity's history. The first people that wrote works on medicine and medicinal plants were Chinese and Egyptian. Hipocrates used and it classified hundreds of drugs of vegetable origin. The external otitis in small animals is the most common disease diagnosed in dogs and, therefore it is outstanding her importance in the clinic. The objective of this work was to present a possible treatment alternative for the external otitis through the evaluation of the activity antimicrobial in vitro of three types of extracts of the plants *Origanum vulgare* L. ("oregano") and of *Thymus vulgaris* L. ("thyme"), an oil extract, a methanol extract and one aqueous extract. The extracts were tested through broth microdilution assay front the isolated of *Malassezia pachydermatis*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600). analysis chromatography of the oils was accomplished, for their representatives' comparison. The oily extracts presented CIM lower front the microorganisms, however, the extracts with better income were the methanol extracts.

Key words: *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, extracts, chromatography, otitis.

INTRODUÇÃO

A história relata o uso de plantas superiores e de suas preparações no tratamento de diversas enfermidades (MITSCHER *et al.*, 1987). As plantas condimentares têm motivado inúmeras análises dos mais variados tipos de eventos e tem propiciado avanços importantes para o tratamento de várias patologias. Embora questões como estratégias a serem empregadas no estudo das plantas, tipos de extratos a serem preparados, métodos utilizados e sua reprodução em experimentos não são aspectos que se encontram em total concordância entre os pesquisadores, há um aspecto em comum que todos concordam: se a seleção de plantas for feita a partir de seus usos tradicionais (uso popular) a margem de sucesso da pesquisa é muito maior por estas observações se tratarem de indicativos das propriedades das plantas medicinais (DI STASI, 1996).

A planta *Origanum vulgare* L. (GARCIA *et. al.*, 2001; MOCKUTE *et.al.*, 2003), é uma planta perene que se adapta a solos secos e calcários (KEN, 1951). O *Thymus vulgaris* L. é uma planta distribuída em áreas no mediterrâneo e Ásia, assim como o orégano pertence à família das Lamiáceas (BADI *et al*, 2004), os componentes destas plantas são estudados por alguns autores que caracterizam seus componentes principais como timol e carvacrol (SIATIS, *et al.*, 2005; DAFERERA, *et. al.*, 2000; GUILLÉN & MANZANOS, 1998)

O óleo essencial de tomilho apresenta ações anti-séptica, expectorante, carminativa e antiespasmódica relacionadas ao teor em timol e carvacrol, que constituem 40 a 50% do óleo essencial utilizado como anti-séptico, flavorizante e antioxidante. Comparados com o fenol, o timol e o carvacrol apresentam maior atividade antibacteriana e antifúngica e menor toxicidade (SIMÕES, 2004).

A otite externa em pequenos animais é a doença mais comumente diagnosticada em cães e, portanto é marcante a sua importância na clínica (CRESPO, *et. al.*, 2002; PLANT, *et. al.*, 1992) A ocorrência de *M. pachydermatis* é encontrada em otite externa como agente perpetuante, facilitada pela utilização excessiva de antibacterianos que eliminam bactérias comensais competidoras (LOBELL, 1995).

MATERIAIS E MÉTODOS

Origem das plantas

As folhas da planta *O. vulgare* L. foram obtidas de fonte comercial (Quimer Comercial Ltda.), já previamente secas e com respectivo laudo agrônomo e botânico. *T. vulgaris* L foi coletado de horta de plantas medicinais, em assentamento da reforma agrária (Cooperativa de Produção Agropecuária Vista Alegre), Município de Piratini (4587E, 6070N). As suas folhas foram secas ao ar livre, protegidas do sol e da chuva. Uma exsicata foi depositada no herbário do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas e identificada pela Dra. Leila Macias.

Extração do óleo das amostras

A extração dos óleos do *Origanum vulgare* e do *Thymus vulgaris* foi feita por arraste de vapor com Clevenger modificado conforme a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (1988), 100g de cada planta foram colocadas em um balão de vidro com 500ml água destilada estéril, através da ebulição o vapor passou pelo aparelho arrastando o óleo. A mistura de vapores foi conduzida a um condensador onde os vapores voltaram ao estado líquido e foram recolhidos em um separador. O volume de óleo retirado após quatro horas de extração de cada planta foi de 1,7ml. Os óleos foram retirados por decantação e após serão secos com Na₂SO₄ anidro e concentrado sob nitrogênio (CRAVEIRO *et. al.*, 1981).

Cromatografia

A análise cromatográfica foi realizada por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM). realizada no laboratório de fitoquímica, no Instituto de Química orgânica da Universidade Federal de Pelotas. Foi injetado no cromatógrafo (GC/FID Shimadzu Mod. 17 A, coluna capilar com 5% diphenil/95% dimethylsiloxane) 1µl da amostra de óleo das plantas no cromatógrafo, com objetivo de caracterizar e comparar os constituintes principais timol e carvacrol das duas plantas.

Preparação das tinturas

Foram preparadas tinturas das plantas utilizando-se uma parte das plantas secas para dez partes de álcool de cereais a 70° GL. As plantas permaneceram em maceração por 15 dias e os frascos foram agitados várias vezes por dia durante este período (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Após o período de maceração, as tinturas foram filtradas, restituídos os volumes de álcool e conservadas em frasco âmbar até a sua utilização. No dia do teste foi retirado o álcool utilizando-se evaporador rotativo à 55°C sob 600 mm/hg de pressão negativa. Após a retirada do álcool o volume inicial foi repostado com água destilada estéril, para a utilização das tinturas nos testes de microdiluição.

Preparação dos decoctos

Os decoctos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). foram preparados utilizando-se uma parte da planta para dez de água destilada estéril mantida em ebulição por 10 minutos. Foram preparados momentos antes de sua utilização devido à possibilidade de degradação do extrato (SIMÕES, 2004).

Microrganismos

Para determinar a susceptibilidade das cepas frente aos extratos de *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* L. será utilizado o método de Microdiluição em Caldo (NCCLS, 1997) modificado por Nascente (2001), com determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos das amostras de orégano e tomilho (LAMBERT, *et. al.*,2001; MANOHAR, *et. al.*,2001). As cepas de referência de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600). foram ativadas através do cultivo em ágar sangue e BHI líquido, mantidos sob agitação. Os isolados de *Malassezia pachydermatis* foram obtidos através da coleta de material do meato acústico externo de cães com otite externa clínica utilizando-se swabs estéreis e feita a semeadura em meio Mycosel®(DIFCO) cultivadas em estufa a temperatura de 35°C. Após 72hs foi observado crescimento das colônias, que foram

identificadas através do seu exame macro, microscópico e por sua característica não lipo-dependente.

Os extratos foram diluídos em base logarítmica dois em meio de cultura e cem µl de cada diluição foram adicionados em orifício de uma microplaca de 96 orifícios. Os microrganismos foram diluídos em meio de cultura e foram colocados cem µl em cada orifício das microplacas. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas para *Malassezia pachydermatis* e 24 horas para as bactérias. Foram mantidos controles positivos e negativos, duas repetições foram realizadas. O crescimento microbiano foi avaliado por turvação e a CIM foi a recíproca da diluição dos extratos onde não houve crescimento visível (LAMBERT, *et. al.*,2001; MANOHAR, *et. al.*,2001).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A cromatografia mostrou diferenças dos constituintes entre as plantas. O óleo de *Thymus vulgaris* apresentou sete picos compatíveis com os padrões utilizados (Mirceno, p-cimeno, 1,8 cineol, linalol, 4-terpineol, α-Terpineol e timol). Ao menos outros 17 constituintes foram observados, muitos deles em quantidades maiores que o teor de timol. A quantidade de carvacrol cujo pico aparece muito sutil no cromatograma, indicando uma quantidade muito baixa deste constituinte. Daferera et al. (2000) identificou alto teor de Timol (63%) em tomilho de origem grega.

Quanto ao *O. vulgare* L., puderam ser identificados 10 constituintes relacionados aos padrões (α-terpineno, p-cimeno, limoneno, γ-terpineno, terpinoleno, linalol, 4-trpineol, α-Terpineol, timol e carvacrol), sendo a relação timol x carvacrol próxima a 1:1. Ainda, o pico de 4-terpineol apresentou-se muito semelhante ao dos constituintes principais.

Rodrigues et al. (2004) identificaram uma proporção muito superior de timol do que carvacrol em *O. vulgare* L. cultivado na região sul do Rio Grande do Sul. Também, nessa amostra pode ser identificada grande quantidade de hidrato de cis-sabineno (pico de amplitude semelhante ao do timol).

A variação na constituição do óleo essencial tem levado a tentativa de classificar a planta em diferentes quimiotipos de acordo com o principal constituinte (SKOULA, 1999). Esta variação é dependente da variedade do orégano, da altitude, sazonalidade e outras características agronômicas (MOCKUTE et al., 2003; KOFIDIS et al., 2003).

Os resultados do CIM para os extratos das plantas avaliados estão expressos na Tabela 1. Apesar dos constituintes das duas plantas serem diferentes, a CIM do óleo de orégano e de tomilho foram iguais para as quatro amostras de *M. pachydermatis* (0,5%). Com relação as tinturas, a planta que apresentou melhor resultado foi o tomilho com CIM média de 50%. A CIM do decocto do orégano foi de 25%, o decocto de tomilho não apresentou inibição dos isolados de *M. pachydermatis*. Foram realizadas médias entre as repetições para estabelecer os valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Frente as bactérias o melhor resultado foi dos óleos, sendo que a CIM do óleo de orégano frente a *P. aeruginosa* foi de 12% e frente ao *S. aureus* foi de 1,56%, a CIM do óleo de tomilho foi de 5% para *P. aeruginosa* e 1,25% para *S. aureus*. Hammer et. al. (1999) utilizou óleos comerciais e obteve a CIM de 2,0% para *P. aeruginosa* e para *S. aureus* 0,12%, sua CIM para o óleo de tomilho foi de >2,0% para *P. aeruginosa* e para *S. aureus* 0,25%.

TABELA 1: Resultado do teste de microdiluição em caldo, dos extratos das folhas de *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* L. frente aos quatro isolados de *Malassezia pachydermatis*.

Identificação dos isolados	<i>Origanum vulgare</i> L.			<i>Thymus vulgaris</i> L.		
	Óleo	Tintura	Decocto	Óleo	Tintura	Decocto
	(%) b,x**	(%) b,x	(%) a,x	(%) c,x	(%) b,y	(%) a,x
Malassezia pachydermatis 01	0,5	25	100	0,5	50	100
Malassezia pachydermatis 02	0,5	25	100	0,5	50	100
Malassezia pachydermatis 03	0,5	25	100	0,5	50	100
Malassezia pachydermatis 04	0,5	25	50	0,5	50	100

Mp 01, Mp 02, Mp 03, Mp 04 referem-se à identificação dos isolados;
100=sem inibição.

* CIM expresso em concentração de extrato (v/v).

** Letras diferentes indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre o CIM médio dos extratos, quando comparados diferentes extratos de cada planta (a, b e c) e o mesmo tipo de extrato entre as duas plantas (x,y).

TABELA 2: Resultado do teste de microdiluição em caldo dos extratos das plantas *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* L. frente as bactéria *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Identificação dos isolados	<i>Origanum vulgare</i> L.			<i>Thymus vulgaris</i> L.		
	Óleo	Tintura	Decocto	Óleo	Tintura	Decocto
	(%) b,x**	(%) b,x	(%) a,x	(%) c,x	(%) b,y	(%) a,x
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	12	18,75	75	5	100	100
<i>S. aureus</i> (ATCC 12600).	1,56	6,25	12,5	1,25	50	50

CONCLUSÃO

Todos os extratos oleosos e tinturas inibiram o crescimento dos fungos e das bactérias, o extrato oleoso obteve o melhor resultado, porém o rendimento obtido por esta forma farmacêutica é bem menor por grama de planta com relação aos outras formas de extração. No geral os extratos do orégano apresentaram os melhores resultados quando comparados aos extratos do tomilho.

Referências Bibliográficas

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time o herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**. v.19, p.231-236, 2004.

GRAVEIRO, A.A.; FERNNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza-CE.ed.UFC, 1981.

CRESPO, M. J.; ABARCA,M.L.; CABAÑES, F.J.Occurrence of Malassezia spp in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis external. **Méd Mycol**, v.40, p. 115-121, 2002.

DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOU, M.G. CG-MS Analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxity on *Penicillium digitatum*. **Journal Agricultural Food Chemistry**, 48, 2576-2581, 2000.

DI STASI, L.C. **Plantas Medicinais: Arte e Ciência. Um Guia para o Estudo Interdisciplinar**. São Paulo. ed.UNESP,1996,230p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, ed. Atheneu (S. Paulo), 4º ed., v.1, 1988.

GARCIA, M.A.; SANZ, J. Analysis of *Origanum vulgare* volatiles by direct thermal desorption coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 918, p.189-194, 2001.

GUILLÉN, M.D.; MANZANOS, M.J. Study of the composition of the different parts of a Sapanish *Thymus vulgaris* L plant. **Food Chemistry**. v.63, nº.3,p.373-383, 1998.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**. v.86, p.985-990, 1999.

KEN, H.W.Y.In: Tratado de farmacognosia - **Drogas de origen Vegetal-Mejorana**, Editorial Atlante, México, 1951, p.934,938.

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. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, 453-462, 2001.

LOBELL, R.; WIENGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite canina. **A Hora Veterinária**, v.88, Porto Alegre, p.29 - 33, 1995.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Cândida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry** 228, 111-117, 2001.

MITSCHER, L.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; OKUTE, S. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **Journal of Natural Products**. v.50, n.6, p. 1005 -1040, 1987.

MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* growing wild in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p.269-278, 2003.

NCCLS – **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard. M27 – A, 17, n.9, 1997.

SIATIS, N. G.; KIMBARIS, A. C.PAPPAS, C.S.; TARANTILIS, P.A.; DAFERERA, D.J.; POLISSOU, M.G. Rapid Method for Simultaneous Quantitative Determination of Four Major Essential Oil Components From Oregano (*Oreganum* sp.) and Thyme (*Thymus* sp.) Using FT-Raman Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.** v.53, p.202-206, 2005.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Ed. da UFRGS/ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis, SC, 2004, p.1002.

SKOULA, M.; GOTSIOU, P.; NAXAKIS, G.; JOHNSON, C.B. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). **Phytochemistry** 52, 649-657, 1999.

5.CONCLUSÕES GERAIS

Todos os extratos inibiram o crescimento dos fungos e das bactérias com exceção dos decoctos que não apresentaram resultados tão satisfatórios, o extrato oleoso obteve o melhor resultado, porém o rendimento obtido por esta forma farmacêutica é bem menor por grama de planta com relação aos outras formas de extração.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

ARRUDA, M.S.P.; GILIOLI, S.; VILANI-MORENO, F.R. Experimental Dermatophytosis in hamsters inoculated with *Trichophyton mentagrophytes* in the cheek pouch. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo** v.43 (1), 29-32, 2001.

BADI, H. N.; YAZDANI, D.; ALI, S. M.; NAZARI, F. Effects of spacing and harvesting time on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. **Industrial Crops and Products**. v.19, p.231-236, 2004.

BALDA, A.C.; LARSSON, C.E.; OTSUKA, M.; GAMBALE, W. Estudo retrospectivo de causuísticas 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.

BERTELLI, D.; PLESSI, M.; MIGLIETA, F.; Effect of microwaves on volatile compounds in origanum – **Swiss Society of Food Science and Technology**, v.36:555-560 (2003).

BONALDO, S.M., SCHWAN-ESTRADA, K.R.F., STANGARLIN, J.R., TESSMANN, D.J. & SCAPIM, C.A. Fungitoxicidade, atividade elicitora de fitoalexinas e proteção de pepino contra *Colletotrichum lagenarium*, pelo extrato aquoso de *Eucalyptus citriodora*. **Fitopatologia Brasileira**. v.29:128-134. 2004.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. Antibacterial activity of select plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. **Letters in Applied Microbiology**, v. 36, 162-167, 2003.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ed. Tecmed, São Paulo (2004), p.480.

CRAVEIRO, A.A.; FERNANDES, A.G.; ANDRADE, C.H.S.; MATOS, F.J.A.; ALENCAR, J.W.; MACHADO, M.I.L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Fortaleza-CE.ed.UFC, 1981.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Malassezia* spp in the external ear canals of dogs and cats with and without otitis external. **Méd Mycol**, v.40, p. 115-121, 2002.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, ed. Atheneu (S. Paulo), 4^o ed., v.1, 1988.

GARCIA, M.A.; SANZ, J. Analysis of *Origanum vulgare* volatiles by direct thermal desorption coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 918, p.189-194, 2001.

GARCIA, M.A.; SANZ, J. Analysis of *Origanum vulgare* volatiles by direct thermal desorption coupled to gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, 918, p.189-194, 2001.

KOFIDIS, G.; BOSBALIDIS, A.M.; MOUSTAKAS, M. Contemporary Seasonal and Altitudinal Variations of Leaf Structural Features in Oregano (*Origanum vulgare* L.) **Annals of Botany**. 92: 635-645, 2003.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACARI, E.M.; MELO, N.T. Identificação dos fungos. In: **Fungos Actinomicetos e Algas de interesse médico**, ed. Savier, São Paulo (Brasil), 1998, p.130.

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. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, 453-462, 2001.

LOBELL, R.; WIENGARTEN, A.; SIMMONS, R. Um novo agente para o tratamento da otite canina. **A Hora Veterinária**, v.88, Porto Alegre, p.29 - 33, 1995.

MAFIA, R.G., ALFENAS, A.C., MAFFIA, L.A., VENTURA, G.M., FERREIRA, E.M., NEVES, I.F., VANETTI, C.A. & SILVA, C. Queima foliar e tombamento de mudas em plantas medicinais causadas por *Rhizoctonia solani* AG1 - 1B. **Fitopatologia Brasileira** 30:302-306. 2005.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; ECHARD, B.W.; BAGCHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Cândida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry** 228, 111-117, 2001.

MITSCHER, L.; DRAKE, S.; GOLLAPUDI, S.R.; OKUTE, S. A modern look at folkloric use of anti-infective agents. **Journal of Natural Products**. v.50, n.6, p. 1005 -1040, 1987.

MOCKUTE, D.; BERNOTIENE, G.; JUDZENTIENE, A. The β -ocimene chemotype of essential oils of the inflorescences and the leaves with stems from *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* growing wild in Lithuania. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 31, p.269-278, 2003.

NASCENTE, P.S. ***Malassezia pachydermatis* em cães e gatos: estudo da frequência e avaliação da sensibilidade aos antifúngicos cetoconazol, fluconazol e itraconazol**. Pelotas-RS, 2001, 84p. Dissertação de Mestrado em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, 2001.

NCCLS – **National Committee for Clinical Laboratory Standards**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: Approved Standard. M27 – A, 17, n.9, 1997.

PINHEIRO, A.D.; MOREIRA, J.L.B.; SIDRIM, J.J.C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 30 (4): 287-294, jul-ago, 1997.

PALACIO, A.del; GARAU, M.; CUÉTARA, M.S. Tratamiento actual de las dermatofitosis. **Revista Iberoamericana de Micología**. 19: 68-71, 2002.

PLANT, J.D.; ROSENKRANTZ, W.S.; GRIFFIN, E.C. Factors associated with and prevalence of high *Malassezia pachydermatis* numbers on dog skin. **J.A.V.M.A.**, v.201, n.6, P.879-882, 1992.

RODRIGUES, M. R. A.; KRAUSE, C. L.; 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.** 54, 3042-3047, 2004.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. Ed. da UFRGS/ed. da UFSC, Porto Alegre, RS/Florianópolis, SC, 2004, p.1002.

SCHIMITT, A.C.; ALMEIDA, A.B.P.F.; SILVEIRA, T.A.; IWAKURA, C.T.; MENDES, K.F. & SILVA, M.C. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da planta *Bryophyllum pinnatum* Kurz (folha-da-fortuna) colhida em Várzea Grande, Mato Grosso/Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**. 31(1): 55-58, 2003.

SIATIS, N. G.; KIMBARIS, A. C. PAPPAS, C.S.; TARANTILIS, P.A.; DAFERERA, D.J.; POLISSOU, M.G. Rapid Method for Simultaneous Quantitative Determination of Four Major Essential Oil Components From Oregano (*Oreganum* sp.) and Thyme (*Thymus* sp.) Using FT-Raman Spectroscopy. **J. Agric. Food Chem.** v.53, p.202-206, 2005.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Ed. Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro, RJ, 2004, p.388.

SKOULA, M.; GOTSIOU, P.; NAXAKIS, G.; JOHNSON, C.B. A chemosystematic investigation on the mono- and sesquiterpenoids in the genus *Origanum* (Labiatae). **Phytochemistry** 52, 649-657, 1999.

SÖKMEN, M.; SERKEDJIEVA, J.; DAFERERA, D.; GULLUCE, M.; POLISSOU, M.; In Vitro Activity Antioxidant, Antimicrobial, and Antiviral Activities of the

Essential Oil and Various Extracts from Herbal Parts and Callus Cultures of *Origanum acutiens*. **J. Agric. Food Chem.** 52, 3309-3312, 2004.

STRYCHARZ, S.; SHETTY, K. Response of oregano (*Origanum vulgare* L.) clonal lines to *Pseudomonas* sp. Z strain and polyde R-478 and implications for hyperhydricity prevention in tissue culture. **Process Biochemistry** 38, 343-350, 2002.

SUMMERBELL, R.C. Form and function in the evolution of dermatophytes. 2000.<http://www.dermatophytes.reviberoammicol.com/p030043.pdf>. Acessado em 02/01/2006.

ANEXO 1

 Quimer ervas medicinais		Controle de Qualidade Dados Técnicos e Identificativos E-mail: quimer@alinet.com.br Website: www.quimer.com.br		Técnico Resp.: CRF : DRA. MARISE V. RASEBANA Data : 10.5.06 Ass.: <i>Marcos</i> 28/10/06 Registro IBAMA: 187954 Registro M.S.: 1.04.653-0 SUDS: 801010123361/90 Ag. Vg. Sanitária: 02.2384/9101	
Quimer Comercial Ltda. Rua Andaraí, 789/799/821 - Vila Maria - Cep 02117-001 - São Paulo - SP - Brasil Fone/Fax: +55 (11) 6955-8800 - CNPJ: 06.824.987/0001-06 - INSC. EST: 113.478.712/111					
Produto		: OREGANO (ORIGANUM VULGARE)			
Família	:	Método de Plantaio	:		
Classificação (NCM)	:	Número/Nosso Pedido	:	150407	
Método de Secagem	:	Peso do Item	:	500,00 KGs	
Procedência	:	Volumes do Item	:	50 SCs	
Origem	:	Tara por Volume	:	0,10 KGs	
Odor e sabor	:	Data da Moagem	:	/ /	
Parte Utilizada	:	Granulometria	:		
Colheita (Mês/Ano)	:	Esterilização	:	NÃO HOUVE	
Número do Lote	:	Validade	:	VER COLHEITA	
Aspecto Macroscópico: AS FOLHAS SÃO INTEIRAS, PECIOLADAS, OVAIS E PONTIACUDAS.					
Aspecto Microscópico: EPIDERME DA FOLHA COM CELS. DE PAREDES SINUOSAS A ONDULADAS. MUITOS TRICOMAS GLANDULARES EM AMBAS AS SUPERFÍCIES E DO TIPO DAS LABIADAS COM UMA HASTE CURTA, UNICELULAR E GLANDULA RADIAL.					
■ ARMAZEMAR EM LOCAL SECO E AREJADO, LONGE DO CALOR DIRETO E DA UMIDADE, MANTENDO O PRODUTO NA EMBALAGEM ORIGINAL DE PAPEL, NÃO SUBSTITUINDO POR EMBALAGENS CONFECCIONADAS COM RESINAS PLÁSTICAS DE BAIXA DENSIDADE. ■ ESTE PRODUTO CORRESPONDE AOS PADRÕES DE QUALIDADE ESTABELECIDOS: PELA FARMACOPÉIA BRASILEIRA, PELO DICIONÁRIO DAS PLANTAS EDITADO NO MINISTÉRIO DA AGRICULTURA E OUTRAS FARMACOPÉIAS OFICIAIS ESTRANGEIRAS E A ASSINATURA GRÁFICA É VÁLIDA E AUTENTICADA PELA QUIMER COMERCIAL LTDA. SOMENTE QUANDO ACOMPANHADA DA RESPECTIVA NOTA FISCAL DE VENDA. ■ É DE RESPONSABILIDADE DO CLIENTE EFETUAR A ESTERILIZAÇÃO DESTA PRODUTO ANTES DO SEU CONSUMO, CASO A MESMA NÃO CONSTE NESTE LAUDO.					

ANEXO 2



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde



Laboratório de Materiais de Referência

Informe de Fungo de Referência 04-abr-03

MICRORGANISMO: *Microsporum gypseum*

INCQS: 40005

ORIGEM: ATCC 14683

LOTE: 118340005

DATA DA LIOFILIZAÇÃO: 18/11/1983

HISTÓRIA: ATCC<<--R.J. Mateles <<--Tropical Products Inst. strain
TPI

ISOLAMENTO:

MEIO DE CULTURA INDICADO: Sabouraud Modificado (Emmons)

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 18

TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas): 240

RESPIRAÇÃO: Aeróbica

SOROLOGIA:

PRODUÇÃO DE ENZIMAS:

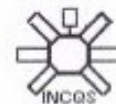
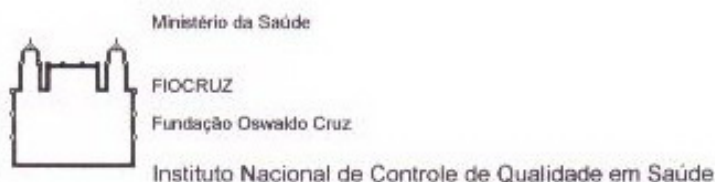
PRODUÇÃO DE TOXINAS:

OBSERVAÇÕES:

REFERÊNCIAS:

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
Tel.: (0xx21) 3865-5186 / 3865-5236 / Fax: (0xx21) 2290-0915

ANEXO 3



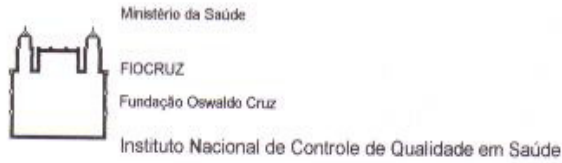
Laboratório de Materiais de Referência

Informe de Fungo de Referência 16-dez-04

MICROORGANISMO:	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>
INCQS:	40004
ORIGEM:	ATCC 9533
LOTE:	088540004
DATA DA LIOFILIZAÇÃO:	13/08/85
HISTÓRIA:	
ISOLAMENTO:	tinea pedis
MEIO DE CULTURA INDICADO:	Sabouraud 2% (Difco 0109)
TEMPERATURA (em Graus Celsius):	82
TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas):	284
RESPIRAÇÃO:	Aeróbica
APLICAÇÃO:	Testing disinfectants, media testing.
SOROLOGIA:	
PRODUÇÃO DE ENZIMAS:	
PRODUÇÃO DE TOXINAS:	
VALIDADE:	Indeterminada se mantida a -20 °C.
OBSERVAÇÕES:	
REFERÊNCIAS:	U. S. Federal Standards and AOAC Methods 4.015-4.019 and 4.030-4.032, 1984.

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
Tel.: (0xx21) 3865-5186 / 3865-5236 - Fax: (0xx21) 2290-0915

ANEXO 4



Laboratório de Materiais de Referência

Informe de Fungo de Referência 16-dez-04

MICROORGANISMO: *Microsporium canis*

INCQS: 40045

ORIGEM: ATCC 32903

LOTE: 098940045

DATA DA LIOFILIZAÇÃO: 19/09/89

HISTÓRIA:

ISOLAMENTO: Persian cat and its owner, Japan

MEIO DE CULTURA INDICADO: Oat Meal Salts

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 26

TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas): 432

RESPIRAÇÃO: Aeróbica

APLICAÇÃO:

SOROLOGIA:

PRODUÇÃO DE ENZIMAS:

PRODUÇÃO DE TOXINAS:

VALIDADE: Indeterminada se mantida a -20 °C.

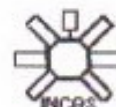
OBSERVAÇÕES:

REFERÊNCIAS:

ANEXO 5



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Laboratório de Materiais de Referência

Informe de bactéria de referência

16-dez-04

MICROORGANISMO: *Pseudomonas aeruginosa* (CI)

INCQS: 00311

ORIGEM: ATCC 10145

LOTE: 0403311

DATA DA LIOFILIZAÇÃO: 25/01/01

HISTÓRIA: F.Kavanagh <-- Merck, Sharp & Dhome (NCIB 8295, NCTC 10332)

ISOLAMENTO:

MEIO DE CULTURA INDICADO: Agar Nutriente (DIFCO 0001)

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 37

TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas): 24

RESPIRAÇÃO: Aerobiose

APLICAÇÃO: Cepa Tipo. Resistência bacteriana à tinta de latex.

SOROLOGIA:

PRODUÇÃO DE ENZIMAS:

PRODUÇÃO DE TOXINAS:

VALIDADE: Indeterminada se mantida a -20 °C.

OBSERVAÇÕES:

REFERÊNCIAS: Int.J.Syst.Bacteriol. 30:225-420, 1980; 20: 15, 1970; J. Gen.Microbiol. 25:398, 1961; Int.Bull.Bacteriol.Nomencl.Taxon. 14:69-84, 1964.

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
Tel.: (0xx21) 3865-5236 - Fax: (0xx21) 2290-0915

ANEXO 6



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde

Laboratório de Materiais de Referência

Informe de bactéria de referência

16-dez-04

MICROORGANISMO: *Staphylococcus aureus* 'T'

INCQS: 00358

ORIGEM: ATCC 12600

LOTE: 0399358

DATA DA LIOFILIZAÇÃO: 24/03/99

HISTÓRIA:

ISOLAMENTO:

MEIO DE CULTURA INDICADO: Agar Nutriente Difco 0001

TEMPERATURA (em Graus Celsius): 37

TEMPO DE INCUBAÇÃO(em horas): 24

RESPIRAÇÃO: Aerobiose

APLICAÇÃO: Cepa Tipo

SOROLOGIA:

PRODUÇÃO DE ENZIMAS:

PRODUÇÃO DE TOXINAS:

VALIDADE: Indeterminada se mantida a -20 °C.

OBSERVAÇÕES:

REFERÊNCIAS:

Av. Brasil, 4365 - Manguinhos - CEP 21045-900 - Rio de Janeiro - RJ - Brasil
Tel.: (0xx21) 3865-5236 - Fax: (0xx21) 2290-0915

