



Toxicidade Pré-Clínica em Doses Repetidas do Óleo Essencial do *Origanum vulgare* L. (Orégano) em Ratas Wistar

Marlete B. CLEFF ^{1*}, Ana R. MEINERZ ¹, Elisa S. SALLIS ², Tatiana A. ANTUNES ², Antonella MATTEI ², Maria R. RODRIGUES ², Mário C.A. MEIRELES ² & João R.B. MELLO ¹

¹ Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Rua Xavier Ferreira 618, Pelotas 96010-540 RS, Brasil

² Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Veterinária, Campus Capão do Leão, Pelotas, 96010-900, RS, Brasil.

RESUMO. Nas últimas décadas a propriedade inibitória dos óleos essenciais vegetais frente a *Candida* spp. tem sido estudada, estando a do orégano entre eles. Todavia, são escassos os trabalhos sobre a toxicidade do referido óleo. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade do óleo essencial do *Origanum vulgare* administrado em ratas Wistar, adultas. Quatro grupos experimentais foram constituídos, grupo I (óleo por via oral, n = 10); grupo II (controle oral, n = 5), grupo III, (óleo por via intra-vaginal, n = 10) e grupo IV (controle intra-vaginal, n = 5). O tratamento diário foi realizado por 30 dias. Utilizou-se emulsão a 3% vol/vol do óleo essencial de *O. vulgare* que apresentava os seguintes constituintes: γ -terpineol (4,86 %), 4-terpineol (47,95 %), α -terpineol (7,56 %), timol (8,42 %) e carvacrol (9,43 %). Ao final do tratamento, os animais foram sacrificados, sendo realizadas necropsias. Os resultados não evidenciaram qualquer alteração macroscópica nos tecidos do trato reprodutivo e digestório, assim como em fígado, baço e rins. Nas avaliações clínicas, hematológicas e histopatológicas não foram observadas alterações. De acordo com os resultados obtidos, conclui-se que o óleo essencial do *O. vulgare* não causa alterações toxicológicas relevantes, quando administrado à 3% por via oral e intra-vaginal em ratas Wistar, por 30 dias. Outros estudos são necessários, incluindo um período maior de administração e, utilizando óleos com diferentes proporções de terpenos, além da avaliação da toxicidade reprodutiva.

SUMMARY. “Pre-clinic toxicity of the repeated-dose of *Origanum vulgare* L. (*Origanum*) essential Oil in Wistar Rats”. In recent decades the inhibitory property of the essential oils against *Candida* spp. has been studied, and antimicrobial activities of origanum has been evaluated. However, the papers evaluating the toxicity of this oil are scarce. The objective of this work was to evaluate the toxicity of the *Origanum vulgare* essential oil administered orally and intravaginal in adult female Wistar rats. This study was accomplished with 4 groups of female rats, group I (oil administration orally, n = 10); group II (control orally, n = 5), group III, (oil administration intravaginal, n = 10) and group IV (control intravaginal, n = 5). The treatment for 30 days, everyday. The essential oil was used 3 % (v/v) in emulsion, and concentration of main compounds were: γ -terpinene (4.86 %), 4-terpineol (47.95 %), α -terpineol (7.56 %), thymol (8.42%) and carvacrol (9.43%). After the experimental period, necropsy of the animals was accomplished, and macroscopic alterations were not observed in the tissues of the reproductive and digestive systems, as well as in liver, spleen and kidneys. The clinical, hematological and histopathological evaluation didn't demonstrate any alteration. According to the results, the *O. vulgare* essential oil 3 %, when administered orally and intravaginal, during 30 days in Wistar rats, is not responsible for toxicological alterations. Other studies using *O. vulgare* oils with different terpenes concentrations are necessary. Reproductive toxicity investigations are also necessary.

INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas invasivas tem tido um aumento na incidência e fatalidade nas últimas décadas, sendo descritos casos de infecção em humanos e animais, especialmente em imuno-

comprometidos, devidos principalmente ao gênero *Candida* ¹⁻³. Estas leveduras são integrantes da microbiota oral, gastrointestinal e reprodutiva de mamíferos, sendo consideradas patógenos oportunistas ¹⁻⁴. Fatores que alterem o

PALAVRAS-CHAVE: Óleo essencial, *Origanum vulgare*, Ratos Wistar, toxicidade.

KEY WORDS: Essential oils, *Origanum vulgare*, Wistar rats, Toxicity.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: emebum@bol.com.br

equilíbrio parasita-hospedeiro favorecem a instalação da micose podendo ocorrer quadros clínicos leves, graves ou fatais ^{2,4-6}. Estudos demonstram que as infecções por *Candida*, são um fenômeno crescente a nível mundial, representando um problema de saúde pública, devido em parte, a sobrevida de pacientes transplantados e neutropênicos, do uso indiscriminado de fármacos como antibióticos e corticosteróides e das doenças imunodepressoras ^{2,4-7}. Aliado aos crescentes casos da micose tem ocorrido resistência por parte de algumas espécies de levedura frente aos antifúngicos usuais, e relatos de recidivas da enfermidade aumentando assim, a necessidade de pesquisas de novas substâncias com atividade antifúngica ^{2,8}.

Devido a demonstrarem atividade frente a diversas espécies de fungos, os óleos essenciais têm despertado interesse, especialmente os óleos de plantas aromáticas como *Origanum vulgare* ⁹⁻¹². A atividade antimicrobiana do *O. vulgare*, tem sido atribuída aos compostos fenólicos que encontram-se como componentes majoritários no seu óleo essencial, sendo que os principais são os monoterpenos e sesquiterpenos, como α -terpineno, γ -terpineno, ρ -cimeno, carvacrol e timol ^{11,13-16}.

Entretanto, apesar de se observar um aumento no consumo de produtos naturais, com base no argumento de que plantas são totalmente seguras, as supostas propriedades farmacológicas muitas vezes não têm validade científica, por não terem sido investigadas quanto a esta ação em testes *in vitro* ou *in vivo* ¹⁷. Devido a serem produtos de extração de uma espécie vegetal, os óleos essenciais são mais concentrados, apresentando toxicidade mais elevada que a planta de origem ¹⁸, sendo necessário a realização de estudos toxicológicos como suporte de segurança para uso destes produtos ^{17,18} assim o objetivo deste trabalho foi de avaliar a toxicidade do óleo essencial do *O. vulgare* administrado em doses repetidas em ratas Wistar.

MATERIAL E MÉTODOS

Animais experimentais

Foram utilizados ratos albinos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar, fêmeas, adultas, com peso variando de 240 a 250 g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Pelotas (BC-UFPEL). O experimento foi desenvolvido na sala de experimentação do BC-UFPEL, onde os animais foram acomodados em caixas, mantidos em condições controladas de umidade, temperatura e ciclo de claro e escuro, rece-

bendo água *ad libitum* e dieta de acordo com peso corporal.

Antes da administração do extrato, todos os animais foram adaptados ao manuseio e a sondagem pelo período de duas semanas. Todos os procedimentos respeitaram os princípios da ética em Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Grupos Experimentais

O estudo foi realizado com 30 animais que foram divididos em quatro grupos experimentais: *Grupo I*: Dez ratas foram tratadas com 0,5 mL de óleo por via oral, uma vez ao dia, durante 30 dias; *Grupo II*: Cinco ratas utilizadas como controle oral, tratadas com o veículo (Suspensão 0,001% de Tween 80) pelo mesmo período; *Grupo III*: Dez ratas foram tratadas com 0,5 mL de óleo por via intra-vaginal, uma vez ao dia, durante 30 dias; *Grupo IV*: Cinco ratas utilizadas como controle intra-vaginal, tratadas com o veículo (Suspensão de ágar 0,8%) pelo mesmo período.

Dose de Ensaio, Preparo e Administração

A dose utilizada no estudo foi definida a partir dos valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) obtidos nos testes *in vitro* frente a isolados de *Candida*, onde foi estabelecida uma CIM média de 0,3% para o óleo essencial do *O. vulgare*, sendo este valor multiplicado por dez.

Nos grupos experimentais I e III, 0,5 mL do óleo essencial foi utilizado na concentração de 3% vol/vol, sendo que para a via oral foi utilizada emulsão contendo 0,001% de Tween 80 ¹⁹ e para a via intravaginal o óleo foi disperso em suspensão de ágar a 0,8% ⁹. No grupo II, foi administrado 0,5 mL de solução contendo 0,001% Tween 80 ¹⁹, e para grupo IV 0,5 mL de suspensão de ágar a 0,8% ⁹.

Para administração oral foi utilizada sonda flexível Nº 6, e para a via intravaginal utilizou-se como aplicador uma sonda flexível adaptada a seringa graduada de 1 mL.

Obtenção do óleo essencial de *O. vulgare*

A amostra de orégano utilizada no estudo foi adquirida em distribuidor comercial (Torrenueva Vascos Ltda., I.M.M.Reg.S.B.Nº 1082/08, Indústria Uruguaya) que forneceu o produto com certificado de qualidade, de origem e identificação botânica. Cerca de 40 g de folhas secas de orégano foram submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, segundo a

Farmacopéia Brasileira ²⁰, para obtenção do óleo. Após a extração, o óleo foi seco em Na₂SO₄ anidro, grau p.a., concentrado sob N₂ ultra puro e armazenado em frascos âmbar, mantido sob refrigeração até a utilização ¹⁴.

Análise do óleo essencial por Cromatografia Gasosa com detector de ionização por chama (GC/FID)

O óleo essencial obtido foi analisado por GC/FID, sendo caracterizado em função dos principais constituintes químicos. Para tal 1 µL de soluções de concentrações variadas de padrões foram injetadas no cromatógrafo e, comparados com o tempo de retenção de padrões referentes aos principais compostos presentes em amostras de orégano ¹⁴.

Acompanhamento clínico

Os animais pertencentes aos quatro grupos experimentais foram avaliados clinicamente durante os 30 dias, de acordo com o critério clínico descrito na literatura ²¹, sendo feitas observações quanto ao estado geral de cada animal, constatação de modificação da deambulação, piloereção, ocorrência de diarreia e de mortes, além de pesagens semanais de todas as ratas. Para os animais dos grupos I e II, ainda foram observadas alterações comportamentais, como agressividade, consciência e disposição, assim como feitas avaliações do sistema locomotor como presença/ausência de incoordenação e perda de equilíbrio. Nos animais dos grupos II e IV foram feitas avaliações da cavidade vaginal, sendo observados presença/ausência prurido, vermelhidão, descamação e lesão local.

Avaliação hematológica

No final do período experimental foi coletado sangue através de punção-cardíaca, para a realização do hemograma completo. Os exames laboratoriais foram realizados no setor de Patologia Clínica da Faculdade de Veterinária – UF-Pel ^{27,28}.

Análise bistopatológica

Ao final dos 30 dias foi realizada eutanásia dos animais experimentais com tiopental sódico via intraperitoneal na dose de 50 mg/Kg. Durante as necropsias dos animais dos grupos I e II, foram feitas análises macroscópicas e colhidas amostras de tecido da mucosa oral e de órgãos internos como estômago, intestino, baço, rins, fígado. Nas ratas pertencentes aos grupos III e IV, após avaliação macroscópica foi coletado o

trato reprodutivo e órgãos internos como rins, baço e fígado. Os órgãos colhidos para o exame histopatológico foram acondicionados em formol a 10%, sendo, posteriormente, incluídos em parafina e processados, utilizando-se coloração de HE (Hematoxilina-Eosina) e PAS (Ácido Periódico-Schiff), para posterior análise histológica.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise cromatográfica do óleo essencial utilizado no estudo demonstrou como principais componentes químicos os terpenos: 4-terpineol, γ-terpineno, α-terpineol timol e carvacrol (Tabela 1). Embora todos os órgãos de uma planta consigam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar de acordo com a parte da planta analisada e com a espécie estudada ¹⁷. Fatores como tipo de solo, altitude, temperatura, período de insolação, cultivo, condições de secagem e estocagem entre outros, influenciam na composição, qualidade e quantidade de óleo es-

Padrão	Tempo retenção	PM	Área	Concentração
1. α-tujeno	10,054	114	353	0,2533
2. Sabineno	12,566	133	456	0,3270
3. Mirceno	13,754	66	250	0,1791
4. α-phellandrene	14,399	943	3451	2,4736
5. α-terpineno	15,181	1050	3944	2,8272
6. p-cimeno	15,663	255	993	0,7119
7. Limoneno	15,928	1228	5026	3,6026
8. 1,8-cineol	16,061	189	735	0,5270
9. cis-trans β cimene	16,758	29	113	0,0810
10. γ-terpineno	17,974	1693	6780	4,8600
11. trans-sabinene-hidrate	18,489	24	96	0,0690
12. terpinolene	19,952	559	2364	1,6947
13. cis-sabinene-hidrate	20,582	26	107	0,0764
14. Linalol	20,873	963	4028	2,8872
15. trans-p-menthenol	22,180	40	173	0,1241
16. cis-p-menthenol	23,121	14	74	0,0528
17. borneol	25,203	83	379	0,2719
18. 4-terpineol	26,136	12183	66900	47,9525
19. α-terpineol	27,02	2294	10555	7,5656
20. trans-piperitol	27,433	99	482	0,3455
21. methyl-tymol-éter	30,280	30	135	0,0969
22. methyl-carvacrol-éter	30,894	215	990	0,7094
23. geraniol nerol	31,887	191	976	0,6997
24. Timol	34,418	2523	11750	8,4221
25. Carvacrol	35,002	2807	13165	9,4363
26. geraniol/neril acetato	40,557	64	281	0,2016
27. β-caryophyllene	42,537	783	4068	2,9156
28. spathulenol	52,373	155	823	0,5899
29. caryophyleno oxide	52,745	16	65	0,0462

Tabela 1. Principais compostos e respectivas concentrações de terpenos encontrados no óleo essencial do *O. vulgare* analisado por cromatografia gasosa (CID/GSM).

sencial presente nos vegetais ^{13,14,22,23}. Em nosso estudo foram utilizadas as folhas e flores secas e desidratadas de *O. vulgare*, sendo que os resultados na análise cromatográfica foram condizentes aos dados da literatura, onde descrevem como componentes químicos majoritários os compostos ρ -cimeno, terpinoleno, γ -terpineno, α -terpineol, linalol, 4-terpineol, timol, carvacrol e germacreno-D e α -pineno, dentre outros ^{10,11,14,22}.

Durante o período de observação de 30 dias, nenhum dos animais experimentais (grupos I, II, III, IV) apresentou alterações clínicas, comportamentais, de deambulação ou morte, ao receberem o óleo essencial do *O. vulgare* a 3%, ou respectivos controles, não havendo diferenças estatísticas entre os grupos. Em relação a massa corporal, observou-se um ganho de peso semanal dos animais conforme o esperado para a espécie estudada (Tabela 2).

A ausência de efeitos colaterais pelo o uso do *Origanum vulgare* foi demonstrada em outros estudos com animais domésticos ^{9,24,25}. A adição de folhas secas da planta na dieta de suínos resultou em maior índice reprodutivo em leitoas, além de melhorar a atividade metabólica intestinal desses animais, e quando adicionou 1000 ppm do óleo essencial de *O. vulgare* na dieta, não foram observadas quaisquer alterações ²⁴. Segundo os autores os efeitos positivos do vegetal na saúde e produção de suínos podem ser devido à ação antioxidante, antibacteriana e antiinflamatória ²⁴, sendo que a propriedade anti-radical atribuída ao *O. vulgare* se deve a presença dos monofenóis, carvacrol e timol ¹¹. Outros autores ao adicionar o óleo essencial do *O. vulgare* (300 mg/kg) á ração de aves poedeiras constataram uma diminuição na contaminação por hemoparasitas ²⁵. Estudos da ação de compostos isolados são escassos, entretanto a avaliação de eugenol e carvacrol em ratos demonstrou que as substâncias não causaram efeitos colaterais ou tóxicos ^{9,16}.

Em relação a análise hematológica, o estudo demonstrou que o uso do óleo essencial na concentração de 3% por via tópica ou oral, assim como seus respectivos controles, não provocou alteração no hemograma, eritrograma (hematócrito, hemoglobina e contagem de hemácia) e leucograma (leucócitos, neutrófilos e linfócitos), resultando em níveis fisiológicos para a espécie estudada ^{26,27} (Tabela 3). O hemograma constitui o meio mais direto e prático de se estudar os elementos figurados do sangue periférico ^{26,27}. Estes elementos celulares sofrem alterações no decurso de, praticamente, todas as enfermidades ^{27,28}. Efetivamente, estas alterações são inespecíficas, comuns a um grande número de patologias, porém os achados hematológicos fornecem informações diagnósticas valiosas sobre o sistema hematológico e outros sistemas orgânicos, prognóstico, resposta ao tratamento e recuperação ²⁸. A maioria dos distúrbios hematológicos podem ser identificados por anormalidades específicas desses resultados, sendo que na identificação de estados patológicos o sangue muitas vezes pode fornecer informações diagnósticas valiosas ²⁶⁻²⁸.

No estudo anatomopatológico dos órgãos e tecidos coletados durante a necrópsia, também não foram evidenciadas alterações macroscópicas ou morfológicas, assim como em relação ao estudo histopatológico das amostras coletadas dos animais experimentais, sem diferença entre os grupos.

Segundo estudos os testes de toxicidade prolongada envolvem a avaliação patológica grosseira, nesta etapa deve-se pesar os órgãos vitais, que serve como índice útil da toxicidade ²⁹. Os pesos dos órgãos estão listados na Tabela 4. Os resultados demonstraram que a administração deste quimiotipo de *O. vulgare* e dos controles, pelo período de 30 dias, na concentração e modelo animal utilizados, não causou alteração na massa dos órgãos analisados.

Grupos Experimentais	Massa Inicial (g)	2ª. Pesagem	3ª. Pesagem	4ª. Pesagem	Massa Final (g)
G I (n=10)	238,7 $\pm$ 7,99	245,2 $\pm$ 8,98	248,9 $\pm$ 8,92	254 $\pm$ 8,99	261,2 $\pm$ 8,24
G II (n=5)	237 $\pm$ 3,53	241 $\pm$ 5,83	248,2 $\pm$ 5,93	253 $\pm$ 5,79	260,4 $\pm$ 5,90
G III (n=10)	240,7 $\pm$ 4,67	245,9 $\pm$ 3,38	252,5 $\pm$ 5,46	258 $\pm$ 4,21	264,6 $\pm$ 4,19
G IV (n=5)	242,2 $\pm$ 6,90	247 $\pm$ 7,28	253 $\pm$ 7,51	257,8 $\pm$ 7,46	263,8 $\pm$ 6,68

Tabela 2. Média $\pm$ desvio padrão da massa corporal dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, intravaginal e respectivos controles, aferidas semanalmente pelo período de cinco semanas. **GI:** *O. vulgare* via oral; **G II:** Suspensão 0,001% Tween 80 ; **G III:** *O. vulgare* intravaginal; **G IV:** Suspensão de Agar 0,8%.

Parâmetros avaliados	G I	G II	G III	G IV
Basófilos (mm ³)	0	0	0	0
Eosinófilos (mm ³)	29 ± 14,5	0	70 ± 46,8	0
Monócitos (mm ³)	0	0	0	0
Linfócitos (mm ³)	3035 ± 95,8	3168 ± 351	4362 ± 1237	3528 ± 207,6
Bastonetes (mm ³)	0	0	0	0
Segmentados (mm ³)	1636 ± 451	1632 ± 85,8	1268 ± 260	772 ± 212
Leucócitos Totais (mm ³)	4700 ± 478	4800 ± 265	5700 ± 1268	4300 ± 110
Eritrócitos (x 10 ⁶ /μL)	6,8 ± 0,68	7,2 ± 0,4	7,42 ± 0,92	7,23 ± 0,55
Hemoglobina (g/dL)	10,7 ± 0,97	11,3 ± 0,46	11 ± 0,65	11,6 ± 1,34
Hematócrito (%)	34 ± 3,27	36 ± 2,5	35 ± 4,63	37 ± 3
PPT (%)	7,4 ± 0,45	6,9 ± 0,5	6,6 ± 0,46	7,5 ± 0,65

Tabela 3. Valores médios ± desvio padrão referentes ao hemograma dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, intravaginal e respectivos controles, aferidas ao final do experimento. **G I:** *O. vulgare* via oral; **G II:** Suspensão 0,001% Tween 80; **G III:** *O. vulgare* intravaginal; **G IV:** Suspensão de Ágar 0,8%.

Órgão	G I	G II	G III	G IV
Cérebro	2,07±0,19	2,0±0,14	1,95±0,24	2,05±0,07
Coração	1,02±0,12	1,10±0,14	1,05±0,13	1,15±0,21
Baço	0,87±0,17	0,90±0,14	0,84±0,15	0,86±0,04
Fígado	9,9±0,26	10,4±0,28	10,1±0,29	10,3±0,14
Pulmão	1,79±0,17	1,84±0,028	1,78±0,13	1,82±0,02
Rim	1,38±0,03	1,40±0,14	1,50±0,21	1,44±0,02

Tabela 4. Média ± desvio padrão da massa dos órgãos (g) dos animais experimentais tratados com óleo essencial do *Origanum vulgare* a 3% por via oral, intravaginal e respectivos controles, aferidas ao final do experimento. **G I:** *O. vulgare* via oral; **G II:** Suspensão 0,001% Tween 80 ; **G III:** *O. vulgare* intravaginal; **G IV:** Suspensão de Ágar 0,8%.

Alguns autores têm descrito que o grau da toxicidade de um extrato depende de vários fatores, entre eles da dose utilizada e da frequência de administração, em alguns casos baixas dosagens acarretam intoxicações devido a sensibilidade individual, provocando desde sensibilização, alergias, até problemas mais graves, principalmente quando utilizados por via oral ^{16,17}. Os monoterpenos com diferentes grupos funcionais tais como, hidrocarbonetos, aldeídos e cetonas são inibidores *in vitro* das monooxigenases CYP2B1, e podem alterar a biotransformação de substâncias tóxicas ^{11,30}. Por outro lado, estudos clínicos têm demonstrado que *Orégano* spp apresenta alergenicidade, sendo recomendado evitar o consumo excessivo durante a gravidez devido a propriedades sedativas e abortivas ¹¹. Estudo utilizando extrato aquoso a 20% de *O. vulgare* em fêmeas prenhes, evidenciaram pequeno atraso no desenvolvimento embrionário, porém o percentual de embriões anormais não

foi significativo, o que foi atribuído ao efeito antimutagênico e antioxidante do extrato ³¹. O potencial anticarcinogênico parece ser devido a capacidade do óleo de *O. vulgare* induzir um incremento na atividade da enzima destoxicante glutathione S-transferase (GST) quando administrado oralmente ³².

Os efeitos adversos do uso de extratos vegetais, possível toxicidade, bem como a ação sinérgica ou antagônica com outros fármacos podem ocorrer comumente, devido a estes e outros fatores, a produção de fitoterápicos requer estudos prévios relativos a vários aspectos, dentre eles quanto ao seu efeito tóxico sobre organismos animais ^{17,18}. *Origanum vulgare* demonstra ter aplicações benéficas na produção de alimentos e na saúde do homem, com custo relativamente baixo devido a uso de pequenas concentrações, sendo considerando um promissor agente antimicrobiano ^{10,24,25}.

CONCLUSÃO

O óleo essencial do *O. vulgare* quando administrado à 3% por via oral e intra-vaginal em ratas Wistar pelo período de 30 dias, não causou efeitos tóxicos, levando em conta a ausência de alterações na massa de órgãos, da massa corporal e da ausência de alterações de hemograma. São necessários outros estudos utilizando outros óleos com diferentes proporções de terpenos, seus principais componentes químicos, além de um período maior administração aos animais experimentais, assim como avaliação da toxicidade reprodutiva.

Agradecimentos. CAPES; CNPq; FAPERGS e PROPESQ/UFRGS.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lacaz, C.S., E. Porto, J.E.C. Martins, E.M. Vaccari & N.T. Melo (2002) *“Tratado de Micologia Médica”*. Sarvier. São Paulo.
2. Colombo, A.L. & T. Guimarães (2003) *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **36**: 599–607.
3. Crocco, E.I., L.M.J. Mimica, L.H. Muramuta, C. Garcia, V.M. Souza, L.R.B. Ruiz & C. Zaitz (2004) *An. Bras. Dermatol.* **79**: 689-97.
4. Cleff, M.B., A.P. Lima, R.O. Faria, A.R.M. Meinerz, T.A. Antunes, F.B. Araújo, P.S. Nascente, M.O. Nobre & M.C.A. Meireles (2005) *Braz. J. Microbiol.* **32**: 201-4.
5. Moretti, A., B. Posteraro, L. Boncio, L. Mechelli, E. Gasperis, F. Agnetti & M. Raspa (2004) *Rev. Iber. Micol.* **21**: 139-42.
6. Moretti, A., L. Boncio, B. Posteraro, L. Mechelli & M. Balducci (2006) *J. Mycol. Med.* **16**: 30-6.
7. Rodriguez, M.C., C. Sotomayor, M.E. Costamagna, B.S. Renteria, A.M. Masini & S. Correa (2003) *Am. J. Phys. Cell.* **284**: 111-8.
8. Sanglard, D. & F.C. Odds (2002) *Lancet Infect Dis.* **2**: 73-85.
9. Chami, N.; F. Chami & S. Bennis (2004) *Braz. J. Infect. Dis.* **3**: 217-26.
10. Busatta, C. (2006) *“Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona”*. Ed. URI Erechim, RS.
11. Arcila-Lozano, C.C., L.P. Guadalupe, L.U. Salvador & E.G. Mejía (2004) *Arch. Latinam. Nutric.* **54**: 1-24.
12. Viegas, E.C., A. Soares, M.G.F. Carmo & C.A. Rosseto (2005) *Hortic. Bras.* **23**: 915-9.
13. Milos, M., J. Mastelic & I. Lerkivic (2000) *Food Chem.* **71**: 79-83.
14. Houmani, Z.(2002) *J Herbs, Spice & Med Plants* **9**: 1049-55.
15. Rodrigues, M.R.A.(2002) *“Estudo dos Óleos Essenciais Presentes em Manjerona e Orégano”*. Ed. UFRGS. Porto Alegre.
16. Vincenzi, M., A. Stamatii, A. Vincenzi & M. Silano (2004) *Fitoterapia* **75**: 801-4.
17. Veiga Junior, V.F., A.C. Pinto & M.A.M. Maciel (2005) *Quim. Nova* **28**: 519-28.
18. Simões, C.M.O., E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz & P.R. Petrovick (2003) *“Farmacognosia: da planta ao medicamento”*. Ed. UFRGS. Porto Alegre.
19. Mondello, F., F.D. Bernadis, A. Girolamo, A. Cassone & G. Salvatore (2006) *BMC Infect. Dis.* **6**: 158.
20. “Farmacopéia Brasileira” (1988) Atheneu. São Paulo.
21. Manson, J.M. & Y.J. Kang (1994) “Principles and methods of toxicology” Raven Press. New York, pp. 989-1034.
22. Rehder, V.L.G., A.L.M. Machado, C. Delarmelina, A. Sartoratto, G.M. Figueira & M.C.T. Duarte (2004) *Rev. Bras. Pl. Med.* **2**: 67-71.
23. Gobbo-Neto, L. & N.P. Lopes (2006) *Quim. Nova* **30**: 374-81.
24. Allan, P. & G. Bilkey (2005) *Theriogen.* **63**: 716-21.
25. Giannenas, I., P. Florou-Paneri, M. Papazahariadou, F. Christaki, N.A. Botsoglou & A.B. Spais (2003) *Arch. An. Nut.* **57**: 99-106.
26. Sanderson, J.H. & C.E. Philips (1981) *“An Atlas of Laboratory Animal Haematology”*. Clarendon Press, Oxford.
27. Duncan, J.R. & K.W. Prasse (1982) *“Patologia Clínica Veterinária”*, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
28. Guimarães, R.X. (1990) *“Clínica e Laboratório: Interpretação Clínica das provas laboratoriais”* Sarvier. São Paulo.
29. Valcarengui, D.A. (2006) *“Avaliação Toxicológica Crônica do polímero Quitosana Ferro (III) Solúvel”*. Ed. Universidade do Vale de Itajaí, SC.
30. De-Oliveira, A., L.F. Ribeiro-Pinto & F.J.R. Paumgartten (1999) *Tox Lett.* **92**: 39-46.
31. Benavides, V., G. Trujillo, G. D’Arrigo, U. Paredes & J. Pino (2000) *Rev. Peru. Biol.* **7**: 86-8.
32. Lam, L.K.T. & B. Zheng (1991) *J. Agric. Food Chem.* **39**: 660-2.