

# Investigação oftalmológica pré-clínica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L., Lamiaceae

## *Ophthalmological pre-clinical research about essential oil from the Origanum vulgare L., Lamiaceae*

Jana Luiza Toscano Mendes de Oliveira<sup>1</sup>, Adriano Francisco Alves<sup>3</sup>, Maria Carmem Toscano Tavares de Araujo<sup>4</sup>, Walter Mendes de Oliveira Junior<sup>4</sup>, Luiza Toscano Dias Rodrigues<sup>4</sup>, Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz<sup>2</sup>.

### RESUMO

**Objetivo:** Avaliar a irritação ocular aguda em coelhos, após a administração tópica de óleo essencial. **Métodos:** Para tanto, os animais foram divididos em três grupos, cada um com três coelhos, totalizando 6 olhos por grupo, e a diferença entre eles foi a concentração utilizada (1, 3 e 9%). Aplicou-se no saco conjuntival, de um dos olhos do animal, uma dose única de 0,1 ml do produto e o olho contralateral foi usado como controle. Analisou-se os efeitos causados pelo óleo essencial na conjuntiva, íris e córnea após 1, 24, 48, 72 horas e no final do sétimo dia após a aplicação tópica. As avaliações oftalmológicas foram feitas com o auxílio de um oftalmoscópio binocular indireto com e sem fluoresceína. As reações observadas foram graduadas segundo a escala de Draize. Foram realizados exames anatomopatológicos em todos os olhos estudados no final do experimento. **Resultados:** No grupo de animais submetidos à instilação ocular do óleo essencial a 1%, não se observou alterações. O tratamento com o óleo a 3% provocou alteração conjuntival no exame feito em 1 hora, o que foi reduzindo. A administração do óleo essencial a 9% induziu hiperemia conjuntival, não havendo qualquer alteração nos outros tempos de avaliação oftalmológica. **Conclusão:** A avaliação contribuiu para conhecer as alterações clínicas na superfície ocular. Desta forma, foi possível classificar o óleo a 1% como não irritante e nas concentrações de 3 e 9% como pouco irritante, tornando possível estudos clínicos, a fim de estabelecer o óleo como alternativa terapêutica em conjuntivites bacterianas.

**Descritores:** Origanum vulgare; Óleos essenciais; Irritantes/toxicidade; Conjuntiva; Conjuntivite bacteriana

### ABSTRACT

**Objective:** To evaluate acute eye irritation in rabbits following topical administration of essential oil. **Methods:** animals were divided into three groups, each containing three rabbits, with a total of 6 eyes per group. The difference between them was the concentration used (1, 3 and 9%). A single dose of 0.1 ml of the product was applied into the conjunctival sac of one eye of the animal, and the contralateral eye was used as control. The effects caused by the essential oil in the conjunctiva, iris and cornea were analyzed after 1, 24, 48 and 72 hours and at the end of the seventh day after topical application. Ophthalmologic evaluations were performed with the aid of a binocular indirect ophthalmoscope fluorescein and with and without the observed responses, before being graded according to the Draize scale. Pathological examinations were performed on all eyes studied at the end of the experiment. **Results:** in the group of animals subjected to the ocular instillation of 1% essential oil, there was no change. For treatment with 3% oil, conjunctival changes were found to be decreasing during the examination after 1 hour. Administration of the 9% essential oil induced conjunctival injection, without any change in the other ophthalmologic evaluation times. **Conclusion:** the evaluation contributed to meet the clinical changes in the ocular surface. Thus, it was possible to classify the oil at 1% as non-irritating and the concentration of 3% and 9 as mildly irritating, making it possible for clinical studies to establish the oil as an alternative therapy in bacterial conjunctivitis.

**Keywords:** Origanum vulgare; Oils, volatile; Irritants/toxicity; Conjunctiva; Conjunctivitis, bacterial

<sup>1</sup>Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, PB, Brasil.

<sup>2</sup>Departamento de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, PB, Brasil.

<sup>3</sup>Programa de Pós-graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, PB, Brasil.

<sup>4</sup>Universidade Federal da Paraíba; João Pessoa, PB, Brasil.

O trabalho foi realizado no Laboratório de Toxicologia pré-clínica do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (PgPNSB) do Centro de Ciências da Saúde (CCS), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brasil.

**Os autores declaram não haver conflitos de interesse.**

Recebido para publicação em 10/10/2015 - Aceito para publicação em 25/01/2016

## INTRODUÇÃO

A conjuntivite bacteriana aguda é uma doença comum e altamente contagiosa, causada pelo contato direto do olho com secreções infectadas <sup>(1)</sup>. Acomete os seres humanos desde a antiguidade <sup>(2)</sup>, sendo caracterizada por um crescimento bacteriano na superfície conjuntival que leva a processo inflamatório agudo ou crônico.

No entanto, as bactérias possuem um número notável de mecanismos genéticos para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos, tornando imprescindível o surgimento de novas drogas que possam manter eficaz a terapêutica de casos infecciosos.

Neste contexto, algumas plantas medicinais e seus óleos essenciais, devido às suas propriedades antimicrobianas, têm despertado o interesse de pesquisadores do mundo inteiro para a investigação de novos antibióticos. Entre essas plantas, destaca-se o orégano (*Origanum vulgare*), pertencente ao gênero *Origanum* (família Lamiaceae) cujo óleo essencial possui atividade antimicrobiana contra bactérias gram positivas e gram negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Rhizobium leguminosarum*, *Bacillus subtilis*) <sup>(3)</sup>.

OLIVEIRA et al <sup>(4)</sup> verificaram em seu estudo que o óleo essencial do *Origanum vulgare* L apresentou a maior atividade antibacteriana, dentre as substâncias testadas contra as principais cepas bacterianas da conjuntivite.

Diante da constatada atividade antimicrobiana do óleo essencial do *Origanum vulgare* L sobre cepas bacterianas isoladas de pacientes com conjuntivite, ficou evidente a importância da avaliação da irritabilidade ocular a fim de determinar se o óleo essencial pode vir a ser utilizado no tratamento tópico de afecções oculares.

O objetivo deste estudo é avaliar a irritação ocular agudamente simples em coelhos e contribuir com uma nova opção de tratamento da conjuntivite em humanos.

## MÉTODOS

A metodologia utilizada para avaliar o efeito do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. sobre o olho foi baseado no trabalho desenvolvido por Draize et al. <sup>(5)</sup> com algumas modificações baseadas no protocolo para teste de irritação ocular da OECD Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) <sup>(6)</sup>.

O coelho albino foi o modelo usado por permitir uma melhor avaliação da irritação ocular devido à ausência de pigmentos na sua mucosa ocular e por apresentar uma ampla e acessível área ocular, permitindo que os efeitos resultantes fossem facilmente observados.

Foram selecionados nove coelhos, todos saudáveis e, cerca de 24 horas antes da realização do teste, os 18 olhos dos animais foram cuidadosamente examinados com uma lanterna de uso oftalmológico para verificar a presença de alguma lesão, caso os animais tivessem apresentado quaisquer sinais de irritação dos olhos ou lesão preexistente de córnea, seriam excluídos do estudo.

As doses do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. utilizados no teste foram: 1, 3 e 9%, que correspondem a dose com efeito bactericida contra agentes bacterianos colhidos de saco conjuntival de portadores de conjuntivite, três e nove vezes esta dose, respectivamente. Com auxílio de uma seringa aplicou-se 0,1 ml do produto, em dose única, diretamente no saco conjuntival de um dos olhos esquerdo de cada animal. O olho contralateral, não tratado, foi utilizado como controle.

Foram analisados os efeitos causados na região da córnea, como opacidade, na região da íris, como irite e na região da conjuntiva, como hiperemia e quemose. Essas reações foram observadas depois de decorridas 1, 24, 48, 72 horas e no final do sétimo dia após aplicação do produto. As avaliações foram realizadas com o auxílio de um oftalmoscópio binocular indireto e uso de colírio de fluoresceína. Todos os exames foram realizados pelo mesmo observador.

As alterações na córnea, íris e conjuntivas foram graduadas de acordo com a escala de graduação das reações oculares de Draize e registradas em formulários apropriados.

O total diário para cada uma das partes analisadas é obtido, segundo Draize, da seguinte maneira:

**Córnea:** (somatório dos valores de opacidade dos coelhos 1...3) x 5

**Íris:** (somatório dos valores de inflamação dos coelhos 1...3) x 5

**Conjuntivas:** (somatório dos valores rubor + edema 1...3) x 2

A média diária (MD) é obtida somando-se os valores obtidos para córnea, íris e conjuntivas para cada tempo de leitura, 1 h (MQ<sub>1</sub>), 24 h (MQ<sub>2</sub>), 48 h (MQ<sub>3</sub>), 72 h (MQ<sub>4</sub>) e sete dias (MQ<sub>7</sub>) e dividindo-se o valor assim calculado pelo número de coelhos utilizados no ensaio. De acordo com o valor obtido, as substâncias podem ser classificadas, na primeira aproximação, em uma das oito categorias listadas no quadro 1. Para tanto, devem ser tomadas as MD dos quatro primeiros dias do ensaio e o maior valor entre os quatro é escolhido. Este valor é a média máxima (MM), a partir desta se determina a classificação de primeira aproximação quadro 1.

Quadro 1

### Valores da classificação de primeira aproximação

Média Máxima (MM)	Classificação de primeira aproximação
00	(N) não irritante
<2,5	(PN) praticamente não irritante
2,5-15,0	(M <sub>1</sub> ) irritante mínimo
15,1-25,1	(M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante
25,1-50,0	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
50,1-80,0	(S) severamente irritante
80,1-100,0	(E) extremamente irritante
100,1-110,0	(M <sub>x</sub> ) irritante máximo

A classificação final corrige a classificação de primeira aproximação e leva em consideração a duração e a intensidade da reação observada. Para tanto, além das médias diárias dos quatro primeiros dias do ensaio (MQ<sub>1</sub> a MQ<sub>4</sub>), devem ser consideradas aquelas obtidas no sétimo dia (MQ<sub>7</sub>) e os valores totais individuais (VTI) do sétimo dia. Se o valor de MQ<sub>7</sub> for diferente do obtido na classificação de primeira aproximação, deve ser feita a classificação final de acordo com o quadro 2.

A córnea, íris e a conjuntiva do olho tratado e controle foram submetidas a exame histopatológico. Quando presente o processo inflamatório, este foi classificado como discreto, moderado e acentuado de acordo com a quantidade de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) presentes. O processo inflamatório foi considerado discreto quando poucas células foram visualizadas, moderado quando uma quantidade aumentada de células era

**Quadro 2**  
**Determinação da classificação final**

Classificação de 1ª aproximação	Casos	Condição	Classificação Final
(N) não irritante	1	Até MQ2=0	(PN) praticamente não irritante
	2	Até MQ3=0	(M <sub>1</sub> ) irritante mínimo
	3	Até MQ4=0	(M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante
	4	MQ7<20;VTI<10	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
	5	20<MQ7<40,VTI<30	(S) severamente irritante
	6	40<MQ7<80;30<VTI<60	(E) extremamente irritante
(M <sub>1</sub> ) irritante mínimo	1	Até MQ2=0	(M <sub>1</sub> ) irritante mínimo
	2	Até MQ3=0	(M <sub>1</sub> ) irritante mínimo
	3	Até MQ4=0	(M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante
	4	MQ7<20;VTI<10	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
	5	20<MQ7<40,VTI<30	(S) severamente irritante
	6	40<MQ7<80;30<VTI<60	(E) extremamente irritante
(M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante	1	Até MQ2=0	(M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante
	2	Até MQ3=0	(M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante
	3	Até MQ4=0	(M <sub>2</sub> ) ligeiramente irritante
	4	MQ7<20;VTI<10	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
	5	20<MQ7<40,VTI<30	(S) severamente irritante
	6	40<MQ7<80;30<VTI<60	(E) extremamente irritante
(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado	1	Até MQ2=0	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
	2	Até MQ3=0	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
	3	Até MQ4=0	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
	4	MQ7<20;VTI<10	(M <sub>3</sub> ) ligeiramente moderado
	5	20<MQ7<40,VTI<30	(S) severamente irritante
	6	40<MQ7<80;30<VTI<60	(E) extremamente irritante
(S) severamente irritante	1	Até MQ2=0	(S) severamente irritante
	2	Até MQ3=0	(S) severamente irritante
	3	Até MQ4=0	(S) severamente irritante
	4	MQ7<20;VTI<10	(S) severamente irritante
	5	20<MQ7<40,VTI<30	(S) severamente irritante
	6	40<MQ7<80;30<VTI<60	(E) extremamente irritante
(E) extremamente irritante	7	40<MQ7<80;30<VTI<60	(E) extremamente irritante
(Mx) irritante máximo	8	MQ<80,VTI<60	(E) extremamente irritante
	9	MQ7<80;VTI>60	(Mx) irritante máximo

facilmente visível, e acentuado, quando havia excessiva quantidade de células inflamatórias, envolvendo uma área extensa.

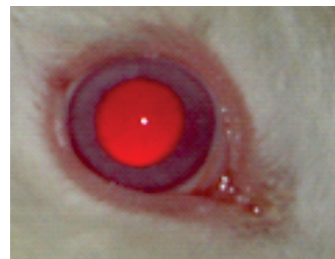
Os resultados numéricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). As diferenças entre grupos foram determinadas através da análise de variância “one-way” (ANOVA) seguido de teste de Dunnett, onde os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes. As análises foram feitas com o auxílio do programa *GraphPad Prism* versão 4 (GraphPad Software Inc., EUA).

## RESULTADOS

As estruturas avaliadas no estudo foram conjuntiva, córnea e íris, observando-se respectivamente: opacidade corneana; irite; quemose e hiperemia conjuntival. Os resultados macroscópicos observados nos olhos dos animais durante o tratamento estão apresentados nos quadros 3, 4 e 5.

Após realização do teste de irritação ocular com o óleo

essencial de *Origanum vulgare* a 1%, não foram identificadas alterações na córnea, íris ou conjuntiva em nenhum dos tempos de observação padronizados pelo método de Draize (Figura 1), resultando em uma média máxima de zero, classificando o produto, nesta concentração, como não irritante (Quadro 3)



**Figura 1:** Olho tratado com óleo essencial a 1%, apresentando aspecto macroscópico normal

Quadro 3

Resultados da avaliação da irritabilidade oftálmica aguda induzida por 1% do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. em coelhos

Estrutura ocular examinada	Soma dos valores obtidos para cada estrutura ocular analisada nos coelhos pertencentes ao estudo em cada tempo de observação (horas)				
	1	24	48	72	168
Córnea	0	0	0	0	0
Conjuntiva	0	0	0	0	0
Íris	0	0	0	0	0
Média diária	0	0	0	0	0
<b>Média máxima ± DP</b>	<b>0,00 ± 0,0</b>				

Ao realizar o teste de irritabilidade ocular primária com o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 3%, evidenciou-se alteração nas conjuntivas na avaliação oftalmológica realizada após 1 hora de instilação da substância (coloração púrpura difusa em um dos animais incluídos no estudo). No exame realizado após 24 horas de uso tópico do óleo essencial, evidenciou-se apenas hiperemia discreta em um dos animais do estudo (Figura 2). Não foram evidenciadas outras alterações oculares em nenhum dos outros tempos de avaliação preconizados neste teste. A média máxima foi de 1,33, classificando o óleo essencial nesta concentração como praticamente não irritante (Quadro 4)



Figura 2: Olho após 24 horas de tratamento com óleo essencial de *Origanum vulgare* 3%, demonstrando hiperemia conjuntival discreta

Quadro 4

Valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize, para óleo essencial de *Origanum vulgare* 3%

Estrutura ocular examinada	Soma dos valores obtidos para cada estrutura ocular analisada nos coelhos pertencentes ao estudo em cada tempo de observação (horas)				
	1	24	48	72	168
Córnea	0	0	0	0	0
Conjuntiva	2	1	0	0	0
Íris	0	0	0	0	0
Média diária	1,33	0,67	0	0	0
<b>Média máxima ± DP</b>	<b>1,33 ± 0,64</b>				

Quadro 5

Valores obtidos após o teste de irritação ocular, segundo escala de Draize, para óleo essencial de *Origanum vulgare* 9%

Estrutura ocular examinada	Soma dos valores obtidos para cada estrutura ocular analisada nos coelhos pertencentes ao estudo em cada tempo de observação (horas)				
	1	24	48	72	168
Córnea	0	0	0	0	0
Conjuntiva	3	2	0	0	0
Íris	0	0	0	0	0
Média diária	2,00	1,33	0	0	0
<b>Média máxima ± DP</b>	<b>2,00 ± 0,8</b>				

O quadro 5 mostra os valores obtidos, segundo os parâmetros preconizados por Draize, após o teste de irritação ocular, instilando-se o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9% no fundo de saco conjuntival de coelhos. Foram evidenciadas alterações apenas nas conjuntivas, coloração vermelha fartamente distribuída na primeira hora (figura 3) e coloração púrpura difusa no exame realizado ao completar vinte e quatro horas de aplicação do produto. Os exames realizados nas 48, 72 e 168 horas, após aplicação da substância, não evidenciaram alteração em nenhuma das estruturas oculares investigadas. A média máxima foi de 2,00, sendo o óleo essencial, nesta concentração, classificado como praticamente não irritante.

Nos exames histopatológicos, nenhuma alteração microscópica foi observada nos olhos dos animais utilizados pelo estudo.



**Figura 3:** Conjuntiva de olho de coelho, após 1 hora de contato com óleo essencial de *Origanum vulgare* a 9%, com coloração vermelha fartamente distribuída

## DISCUSSÃO

A conjuntivite bacteriana é uma doença que acomete o homem desde a antiguidade, já havendo uma descrição acurada dos sinais cardinais da patologia pelos egípcios 1550 anos antes de Cristo<sup>(2)</sup>. É altamente contagiosa e sua transmissão, se dá, tipicamente, pelo contato mão-olho, no entanto, existem outras vias de transmissão, desde formas exógenas, endógenas, por via hematogênica e até por inoculação através de contaminação do olho contra-lateral<sup>(7)</sup>.

O teste de irritação ocular ou Teste Ocular de Draize faz parte dos testes toxicológicos exigidos pelas agências regulatórias para registros de diversos tipos de substâncias. Os resultados obtidos a partir deste teste tem grande importância na decisão da classificação toxicológica de um produto, por ser este, muitas vezes, o dado mais crítico entre os testes toxicológicos<sup>(8)</sup>.

A razão para se estudar os efeitos do óleo de *Origanum vulgare* L. sobre a superfície ocular se dá pelo fato deste óleo apresentar promissora atividade antimicrobiana contra cepas oriundas de pacientes portadores de conjuntivite bacteriana. Assim, temos a expectativa do uso deste óleo como fonte de compostos antimicrobianos que possam ser usados no tratamento de afecções oculares<sup>(4,9)</sup>.

No teste original de Draize três tipos de tecidos são examinados: córnea, íris e conjuntivas. Cada tecido tem diferentes características a serem avaliadas<sup>(5)</sup>. No teste de Draize adaptado pela OECD, 405/2002, examina-se na córnea, a densidade da opacidade, na íris, a irritação, e nas conjuntivas, a hiperemia e o edema.

Após o teste de irritação ocular com o óleo essencial de *Origanum vulgare* na concentração de 1%, que é a dose terapêutica contra bactérias causadoras de conjuntivite, não foram identificadas alterações em nenhuma das estruturas oculares examinadas, em nenhum dos tempos de observação, quando

comparados com o controle. De acordo com o teste utilizado, foi feita uma média diária, que foi alcançada somando-se os valores obtidos para córnea, íris e conjuntiva, para cada tempo de leitura e dividindo-se o valor assim calculado pelo número de coelhos utilizados no ensaio<sup>(10)</sup>. De acordo com o valor obtido, o *Origanum vulgare* 1% foi classificado como substância não irritante, sugerindo que tal componente pode ser usado na superfície ocular sem provocar efeitos tóxicos.

A realização do mesmo teste com o óleo essencial na concentração de 3%, provocou hiperemia conjuntival após 1 hora da instilação do produto no saco conjuntival, estando este efeito bem diminuído após 24 horas e ausente em todos os outros tempos de avaliação. A hiperemia surge no olho devido à vasodilatação local, sendo esta uma manifestação comum em um organismo como resposta à um irritante, com o intuito de liberar mediadores químicos para desativar o agente agressor<sup>(11)</sup>. Como a conjuntiva é amplamente vascularizada e encontra-se, do ponto de vista anatômico, como a primeira camada de contato do olho com o meio externo, constitui importante barreira de defesa do aparelho ocular. Consequentemente, a hiperemia conjuntival é um achado clínico muito comum, mesmo diante de agentes fracamente irritantes<sup>(12)</sup>. Em nosso estudo, apenas um animal manifestou tal sinal e o mesmo desapareceu rapidamente, não sendo considerado como fator importante para considerar a substância agressiva para o olho nesta concentração. Nenhum outro parâmetro encontrou-se alterado em nenhum dos tempos padronizados de exame.

A média máxima é o maior valor de média diária obtida, tomando-se como base as médias diárias dos quatro primeiros dias de observação<sup>(5,6,10)</sup>. Com o óleo essencial a 3%, a média máxima foi de 1,33, o que classifica o produto como praticamente não irritante, portanto sugere segurança para uso como inoculante ocular, mesmo nesta concentração, que é três vezes superior à dose terapêutica.

Como preconizado pela ANVISA através do guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, a avaliação da toxicidade ocular também foi realizada com a concentração de 9% do óleo essencial de *Origanum vulgare*, dose nove vezes maior que a dose terapêutica, a fim de avaliar possíveis efeitos tóxicos diante de uma inoculação acidental de quantidade muito superior a preconizada para um possível tratamento.

Ao completar uma hora da inoculação do óleo essencial a 9% no saco conjuntival do coelho, evidenciou-se coloração vermelha fartamente distribuída na conjuntiva. Este efeito diminuiu, apresentando-se com coloração púrpura difusa na avaliação oftalmológica feita após 24 horas. Nos demais tempos de avaliação, não houve mais alteração conjuntival. Embora a reação inflamatória conjuntival tenha sido um pouco mais pronunciada com o aumento da concentração do óleo essencial, é importante ressaltar que desapareceu, por completo, após 24 horas. Nenhuma das outras estruturas oculares encontrou-se alteradas em nenhum dos tempos padronizados de avaliação oftalmológica. A média máxima calculada foi de 2,00, classificando o produto em praticamente não irritante, o que sugere que, mesmo diante de uma inoculação acidental do produto no olho, isto não resultará em sequelas oculares, demonstrando segurança para uso do produto. Portanto, o tratamento com o óleo essencial, quando induziu alterações nas conjuntivas, estas foram discretas e reversíveis em um período curto após a aplicação do produto.

A córnea é a estrutura mais importante a ser avaliada no teste de irritação ocular, devido ao papel que desempenha no processo da visão. Qualquer desarranjo na córnea é porta de

entrada para processos infecciosos ou causa de distúrbio funcional<sup>(13)</sup>. No presente estudo os animais tratados com todas as doses avaliadas do óleo de *Origanum vulgare* L. não apresentaram alterações na córnea em nenhum dos tempos de avaliação.

O mesmo foi observado para íris, visto que o tratamento com o óleo de *Origanum vulgare* L. não induziu irritação na íris com nenhuma das concentrações testadas.

De acordo com a literatura, o olho de coelho é mais sensível a agentes irritantes que o olho humano. A superfície epitelial do olho do coelho é dez vezes mais permeável aos solutos hidrofílicos que o olho humano. A córnea do coelho é bem mais fina que a dos humanos, com espessura média de 0,37mm, enquanto nos humanos é de 0,51mm. A membrana de Bowman da córnea destes animais é seis vezes mais fina. O limiar de dor do coelho é muito mais elevado do que dos seres humanos, fazendo com que substâncias irritantes sejam removidas lentamente, fato potencializado por um sistema lacrimogêneo menos eficiente, atrasando ainda mais a remoção de substâncias irritantes de sua superfície. Além disso, a córnea representa 25% da área de superfície do olho do coelho e somente 7% da área de superfície ocular humana. Finalmente, o PH do humor aquoso do coelho é de 8,2, comparado com 7,1 a 7,3 para o homem, tornando os coelhos mais suscetíveis aos danos causados por materiais alcalinos.

Na maior parte dos casos, os coelhos albinos são mais sensíveis que o homem aos agentes irritantes. Resultados de ensaios efetuados em outras espécies animais podem reforçar aqueles obtidos com coelhos. É possível, então, extrapolar os dados para os seres humanos<sup>(5,6,10)</sup>.

Nosso estudo demonstrou que o óleo essencial de *Origanum vulgare* a 1% foi não irritante, e nas concentrações de 3 e 9 % praticamente não irritante. Como descrito acima, os olhos de coelhos são mais sensíveis a agentes tóxicos, fazendo-nos sugerir que os efeitos encontrados provavelmente seriam ainda menos significativos em olhos humanos. Associado aos achados macroscópicos, a avaliação microscópica dos olhos após exposição a todas as concentrações do óleo essencial, não evidenciaram alterações significativas quando comparadas aos olhos controle.

O teste de irritação ocular demonstrou que o contato dos olhos estudados com todas as concentrações avaliadas do óleo de *Origanum vulgare* L. produz lesões oculares mínimas, as quais são reversíveis geralmente após as 24 horas de exposição ao produto.

## CONCLUSÃO

Com base nos dados obtidos, conclui-se que a avaliação da irritabilidade oftálmica contribuiu para conhecer as alterações clínicas macroscópicas e microscópicas na superfície ocular dos olhos de coelhos expostos ao óleo essencial de *Origanum vulgare* L., em cada intervalo do teste de irritabilidade ocular. Desta forma, foi possível classificar o óleo essencial de *Origanum vulgare* L a 1%, que é a dose terapêutica, como não irritante e em concentrações bem maiores, 3 e 9%, como praticamente não irritante, sugerindo a necessidade de aprofundar o estudo desta substância com a realização de estudos clínicos e colocando este produto como possível agente terapêutico no tratamento de conjuntivites bacterianas.

## REFERÊNCIAS

1. Martínez BO, Ruiz RM, Pérez RM. Conjuntivitis bacteriana: patógenos más prevalentes y sensibilidad antibiótica. *Anales Pediatr.* 2004;61(1):32-6.
2. Hirschberg J. The history of ophthalmology, vol 1, the history of ophthalmology in antiquity. Bonn: JP Wayenborgh; 1982.
3. Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J Agric Food Chem.* 1996; 44( 5):1202-5.
4. Oliveira JL. Estudo da atividade antibacteriana de óleos essenciais contra agentes etiológicos da conjuntivite bacteriana simples [tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2006.
5. Draize JH, Woodard G, Calvery HO. Methods for the study to irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membrane. *J Pharmacol Experiment Ther.* 1944; 82:377-90.
6. Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). Guidelines for the testing of chemicals, OECD 405. Acute eye irritation/corrosion. Paris: OECD; 2002.
7. Hwang DG, Schanzlin DJ, Rotberg MH, Foulks G, Raizman MB; Levofloxacin Bacterial Conjunctivitis Place-controlled Study Group. A phase III, placebo controlled clinical trial of 0.5% levofloxacin ophthalmic solution for the treatment of bacterial conjunctivitis. *Br J Ophthalmol.* 2003;87(8):1004-9.
8. Wilhelmus KR. The Draize eye test. *Surv Ophthalmol.* 2001;45(6):493-515.
9. Oliveira JL, Diniz MF, Lima EO, Souza EL, Trajano VN, Santos BH. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. *Braz Arch Biol Technol.* 2009; 52(1):45-50.
10. Brito AS. Manual de ensaios toxicológicos in vivo. Campinas: Editora da UNICAMP;1994. 122p.
11. Gigliotti F, Williams WT, Hayden FG, Hendley JO, Benjamin J, Dickens M, Gleason C, Perriello VA, Wood J. Etiology of acute conjunctivitis in children. *J Pediatr.* 1981;98(4):531-6.
12. Huhtala A. Corneal epithelial and retinal pigment epithelial cell culture assays as potencial alternatives to animal experiments for the evaluation of ocular toxicity. Helsinki: Helsinki University of Technology; 2003.
13. Estévez, R. A. Efeito do tacrolimo na reepitelização da córnea em coelhos [tese]. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais; 2004.

### Autor correspondente:

Adriano Francisco Alves.

Rua: Maria das Neves Coutinho, n 45, Bancários, João Pessoa, Paraíba, Brasil.

Fone/Fax: (83) 99675.9944.

E-mail: adrianofalves@gmail.com