

AÇÃO DOS EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DE AROEIRA-MANSA E LANCETA FRENTE A *SPOROTHRIX BRASILIENSIS*

CLAUDIA GIORDANI¹; KARINA AFFELDT GUTERRES²; CAROLINE BOHNEN DE MATOS³; CRISTINE CIOATO DA SILVA⁴; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁵; MARLETE BRUM CLEFF⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – claarte@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – guterres.karina@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – bohncarol@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – criscioato@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – renataosorio@ig.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – emebrum@bol.com.br

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea zoonótica causada por fungos do gênero *Sporothrix*, os quais são dimórficos, apresentando a forma leveduriforme (35°C) no hospedeiro e a forma filamentosa (25°C) no ambiente (MADRID et al. 2011). A principal espécie envolvida na enfermidade é o *S. schenckii* (SOUZA et al. 2006), porém com a caracterização de mais cinco espécies, atualmente tem sido denominado Complexo *Sporothrix*, destacando-se o *S. brasiliensis* identificado em diversos animais na região sul do Brasil (CRUZ, 2013).

O fármaco de escolha para o tratamento da esporotricose é o itraconazol (CORGOZINHO et al. 2006), porém já tem sido relatado casos de resistência a este e também resistência cruzada a outros azóis, tendo que ser associado a outros fármacos para o sucesso terapêutico (OLIVEIRA et al. 2011; GUTERRES et al. 2014). Mediante estas dificuldades, tem se intensificado a pesquisa por novas alternativas terapêuticas, principalmente utilizando plantas medicinais, sob forma de diversos tipos de extrações e partes destas, principalmente de espécies vegetais com ampla distribuição na natureza (GIORDANI et al. 2013).

As plantas Aroeira-mansa (Aroeira-da-praia, Aroeira-vermelha) e Lanceta (Arnica, Espiga-de-ouro) possuem uma alta distribuição em Pelotas-RS, e vem sendo utilizada na medicina popular da região, principalmente para limpeza e tratamento de feridas. Além do uso popular, pesquisas vem demonstrando que essas plantas apresentam diversas ações medicinais, entre elas, a atividade antimicrobiana (GUERRA et al. 2000; DUARTE et al. 2004; GIORDANI, 2013).

Com isso, o objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de aroeira-mansa (*Schinus terebinthifolius*) e lanceta (*Solidago chilensis*) frente a isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis*.

2. METODOLOGIA

As plantas foram coletadas em Pelotas-RS e identificadas no Departamento de Botânica do Instituto de Biologia-UFPEL.

Para preparação dos extratos, pesou-se 100g das folhas de cada planta, misturando a 500mL de álcool de cereais 70%, permanecendo em frasco de vidro estéril hermeticamente fechado, isolado da luz e em temperatura ambiente, durante sete dias, sendo diariamente agitado por um minuto. Após esse período, foi filtrado com gaze estéril e restitui-se o volume com álcool de cereais a 70%, obtendo-se a tintura, que foi armazenada em frasco âmbar estéril hermeticamente fechado em temperatura ambiente SCHIEDECK et al. (2008). No instante dos

testes *in vitro*, os extratos passaram por rotaevaporação à vácuo em banho de aquecimento (40°C) para retirada do solvente, e após foi restituído o volume com água destilada estéril para obtenção do extrato hidroalcoólico.

Foram utilizados sete isolados de *Sporothrix brasiliensis* provenientes de casos clínicos de felinos (n=6) e canino (n=1) estocados no Laboratório de Micologia Veterinária - UFPEL, cultivados em meio Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol a 25°C. A atividade antifúngica foi avaliada pelo teste de microdiluição em caldo, baseado no documento CLSI M38-A2 (2008) com modificações para fitofármacos e *S. brasiliensis*. Sendo testadas seis concentrações seriadas (100-3,12mg/mL) dos extratos vegetais em duplicata.

O inóculo foi preparado a partir de colônias fúngicas com sete dias de crescimento em solução salina, padronizado em espectrofotômetro (λ 530nm, T 70-76%). Foram realizadas duas diluições seriadas, com o inóculo padronizado e solução salina estéril (1:100) e a partir desta, em meio RPMI-1640 (1:20). Os resultados foram expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM), através de leitura visual, e Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para determinação da CFM, foram semeados 10 μ L das suspensões das microplacas em ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol incubadas a 25°C por sete dias. Além disso, o antifúngico padrão itraconazol também foi testado em 10 concentrações seriadas (64 a 0,12 μ g/mL) para avaliar a suscetibilidade dos isolados fúngicos.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos extratos hidroalcoólico demonstraram CIM de 3,12mg/mL e CFM entre 6,25 e 50mg/mL (Aroeira-mansa); e CIM entre 12,5 a 50mg/mL e CFM entre 50 a 100mg/mL (Lanceta), onde dois isolados não foram eliminados. Já em relação ao itraconazol, foi observado CIM de 0,5 a >64 μ g/mL e CFM de 64 a >64 μ g/mL (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do teste de microdiluição em caldo mediante concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos extratos hidroalcoólicos e do antifúngico padrão sobre isolados de *S. brasiliensis*

| Isolado | Extrato (mg/mL) | | | | Antifúngico padrão (μ g/mL) | |
|---------|-----------------|------|---------|------|----------------------------------|-----|
| | Aroeira-mansa | | Lanceta | | Itraconazol | |
| | CIM | CFM | CIM | CFM | CIM | CFM |
| 1 | 3,12 | 12,5 | 50 | >100 | 64 | 64 |
| 2 | 3,12 | 6,25 | 50 | >100 | 8 | >64 |
| 3 | 3,12 | 50 | 12,5 | 50 | >64 | >64 |
| 4 | 3,12 | 25 | 25 | 50 | 0,5 | 64 |
| 5 | 3,12 | 12,5 | 12,5 | 50 | 64 | 64 |
| 6 | 3,12 | 12,5 | 12,5 | 100 | 16 | 64 |
| 7* | 3,12 | 12,5 | 25 | 50 | 16 | 64 |

>100 e >64: sem atividade nas concentrações testadas; *Isolado de canino.

Essas mesmas plantas foram estudadas por RATSLAFF et al. (2013) e demonstraram atividade sobre isolados na forma leveduriforme de *S. schenckii*, porém o extrato de *S. chilensis* teve atividade apenas em três isolados (n=9) com CIM e CFM entre 50 a 100mg/mL, enquanto o extrato de *S. terebinthifolius* obteve inibição de todos isolados (n=9) com CIM entre 3,12 a 12,5mg/mL e CFM entre 6,25 a 12,5mg/mL. Nos dados observados, o extrato de Aroeira-mansa apresentou CIM de 3,12mg/mL em todos isolados e o de Lanceta teve ação sobre

todos isolados, porém com CIM entre 12,5 a 50mg/mL, e com dois isolados sem CFM nas concentrações testadas. Essa variação pode ser explicada pela espécie utilizada no presente trabalho (*S. brasiliensis*) e forma de apresentação do fungo (filamentosa). As diferenças entre as espécies do complexo *Sporothrix* estão no diâmetro médio das colônias, morfologia dos conídios, perfil de assimilação de carbono, sequenciamento genético e assimilação de açúcares (CRUZ, 2013). Em relação a virulência das espécies do gênero, estudo realizado por ARRILLAGA-MONCRIEFF et al. (2009) utilizando modelo experimental murino, descreve o *S. brasiliensis* e *S. schenckii* como as mais virulentas.

Outros trabalhos avaliando extratos destas plantas, também foram realizados com outros fungos, como *Malassezia pachydermatis*, proveniente de casos clínicos de dermatite e otite, onde o extrato hidroalcoólico de Aroeira-mansa apresentou ação sobre todos isolados testados (n=48) e o de Lanceta apresentou baixa atividade, tendo ação apenas em cinco isolados, com CIM entre 25 a 100mg/mL e CFM de 100mg/mL (GIORDANI, 2013). O extrato de aroeira também tem sido relatado com atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* por GUERRA et al. (2000), podendo ser considerado um extrato com grande potencial antimicrobiano. Em outro trabalho de DUARTE et al. (2004), que estudou 45 extratos hidroalcoólicos de plantas, dentre eles, *Solidago chilensis* demonstrou atividade frente a *S. aureus* e *Streptococcus faecium*, com CIM de 0,1 e 1,6mg/mL respectivamente.

Em relação ao antifúngico, tem se observado CIM entre 0,21 a 1,75 µg/mL (*S. schenckii*) (MEINERZ et al. 2007), e 0,015µg/mL a 2µg/mL (*S. brasiliensis*) (MARIMON et al. 2008; OLIVEIRA et al. 2011; NEVES et al. 2012), o que foi diferentemente observado neste estudo, onde as CIM foram maiores. Apesar do CLSI M38-A2 não ser específico para o fungo em estudo, resultados do itraconazol com CIM $\geq 4,0$ µg/mL são tidos como resistentes para certos fungos filamentosos, sendo observado seis isolados com CIM $> 8,0$ µg/mL, além de CFM ≥ 64 µg/mL.

4. CONCLUSÕES

Pode-se concluir que os extratos vegetais testados tiveram atividade sobre o *Sporothrix brasiliensis*, destacando o extrato hidroalcoólico de Aroeira-mansa, tendo atividade até mesmo sobre os isolados com maior resistência ao itraconazol. Por isso, se fazem necessários estudos complementares para a utilização deste extrato como alternativa terapêutica. E além disso, salienta-se o aumento do surgimento de microrganismos fúngicos resistentes, sendo uma problemática na saúde pública.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARRILLAGA-MONCRIEFF, I.; CAPILLA, J.; MAYAYO, E.; MARIMON, R.; MARINÉ, M.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. Different virulence levels of the species of *Sporothrix* in a murine model. **Clinical Microbiology and Infection**, v.15, n.7, p.651-655, 2009.
- CLSI. 2008. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; approved standard, 2.ed. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
- CORGOZINHO, K.B.; SOUZA, H.J.M.; NEVES, A.; FUSCO, M.A.; BELCHIOR, C. Um caso atípico de esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, n.2, p.167-170, 2006.

- CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, n.20, p-8-28, 2013.
- DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; PEREIRA, B. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolóicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 14, n.1, p.6-8, 2004.
- GIORDANI, C. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente a *Malassezia pachydermatis***. 2013. 138f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- GUERRA, M.J.M.; BARREIRO, M.L.; RODRIGUEZ, Z.M.; RUBALCABA, Y. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebenthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.5, n.1, p.23-25, 2000.
- GUTERRES, K.A.; MATOS, C.B.; OSÓRIO, L.G.; SCHUCH, I.D.; CLEFF, M.B. The use of (1-3) β -glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. **Mycopathologia**, v.177, n.3-4, p.217-221, 2014.
- MADRID, I.I.; SANTIN, R.; SCHUCH, L.F.D.; GOMES, A.R.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Análise morfológica e termotolerância de isolados clínicos e do ambiente de *Sporothrix schenckii* do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.18, n.2/3, p.57-61, 2011.
- MARIMON R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In Vitro* Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.2, p.732-734, 2008.
- MEINERZ, A.R.M.; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D.; CLEFF, M.B.; SANTIN, R.; BRUM, C.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.60-62, 2007.
- NEVES, L.V.; RIBEIRO, T.C.; MACHADO, V.S.; DENARDI, L.B.; MARIO, D.A.N.; ALVES, S.H. Avaliação “*in vitro*” da suscetibilidade das novas espécies de *Sporothrix* frente a antifúngicos. In: **SALÃO INTERNACIONAL DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO**, 4., Bagé, 2012. Anais do 4º Salão Internacional de Ensino, Pesquisa e Extensão, Bagé: Universidade Federal do Pampa, v.4, n.2, 2012.
- OLIVEIRA, D. C.; LOPES, P. G. M.; SPADER, T. B.; MAHL, C. D.; ALVES, G. R. T.; LARA, V. M.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H. Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, p.3047–3049, v.49, n.8, 2011.
- RATSLAFF, K.; GIORDANI, C.; ALVES, G.A.; SANTIN, R.; MADRID, I.M.; CLEFF, M.B. Ação dos extratos hidroalcolóico de *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis trimera* e *Solidago chilensis* em *Sporothrix schenckii*. In: **CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**, 22., Pelotas, 2013. Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas: UFPel, 2013.
- SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; NACHTIGAL, G.F.; BAUER, M.V.L. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. **Comunicado técnico-EMBRAPA**, Pelotas, n.190, p.1-4, 2008.
- SOUZA, L.L.; NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; MEIRELES, M.C.A. Isolamento de *Sporothrix schenckii* de unhas de gatos saudáveis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.37, n.3, p. 372-374, 2006.