

Suscetibilidade *in vitro* de isolados de fungos do Complexo *Sporothrix spp.* frente a produtos de Manjerona (*Origanum majorana*)

GISELE BARCELOS SEBERINO¹; STEFANIE BRESSAN WALLER²; ISABEL MARTINS MADRID³; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO⁴; RENATA DE OSÓRIO FARIAS⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas - gibseberino@hotmail.com

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul – waller.stefanie@yahoo.com.br

³ Centro de Controle de Zoonoses – imadrid_rs@yahoo.com.br

⁴ Universidade Federal do Rio Grande do Sul - jmello@gabinete.ufrgs.br

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

⁶ Universidade Federal de Pelotas - meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea e zoonótica, causada por fungos dimórficos do Complexo *Sporothrix spp.*, que acomete os animais e o homem (MADRID et al., 2007). Esse fungo tem distribuição mundial e pode ser encontrado no solo, associado com plantas e matéria orgânica em decomposição (DONADEL et al., 1993; MADRID et al., 2007). Atualmente, o tratamento dessa enfermidade tem como medicamento de eleição o antifúngico denominado Itraconazol, porém alguns autores já relatam casos de resistência de *Sporothrix spp.* a este fármaco (SCHUBACH et al., 2004). Ainda, esse tratamento é oneroso e prolongado, e, portanto, alternativas vem sendo estudadas, tendo como um dos principais ramos de pesquisa a utilização de produtos naturais como recurso terapêutico (CLEFF 2008; LUQMAN et al., 2007;).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, estimada em cerca de 20% do número total de espécies do planeta, e ainda estima-se que 25% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos de fontes de plantas (CALIXTO, 2003). Dentre as espécies de plantas medicinais que mais despertam o interesse da comunidade científica, destacam-se os vegetais da família *Lamiaceae*, embora ainda sem comprovações quanto a risco de toxicidade e dosagem segura (SANTIN, 2013). Alguns autores já descreveram a ação antimicrobiana da manjerona contra diferentes bactérias e fungos e também sua atividade antioxidante (BARATTA et al., 1998; BUSATTA, 2006; CLEFF et al., 2008; SILVA, 2011; SANTIN, 2013). Entretanto, estudos desta planta contra fungos do Complexo *Sporothrix spp.* são escassos (CLEFF et al., 2008). Dentro deste contexto, o presente trabalho buscou avaliar a ação antifúngica do *Origanum majorana* (manjerona) frente a isolados de fungos do Complexo *Sporothrix spp.*, tendo em vista que não existem registros sobre essa atividade na literatura atual, bem como comparar sua eficácia ao itraconazol.

2. METODOLOGIA

Para a produção deste trabalho, foram adquiridas partes aéreas de *Origanum majorana* de um distribuidor comercial (Luar Sul®), as quais foram utilizadas para a produção de soluções de infusão e decoção a 10%. A infusão foi preparada utilizando 10g da planta em 100 ml de água fervente e acondicionada em um frasco fechado por 10 minutos. Já, para a preparação do decocto, da mesma forma, foram utilizados 10g da planta em 100 ml de água e

mantidos em ebulição durante 10 minutos. Após, essas amostras foram filtradas em filtro de papel Whatmann nº1 para a eliminação de resíduos sólidos. Por sua vez, o óleo essencial de manjerona utilizado foi adquirido comercialmente (Ferquima®), com certificação da espécie de planta e mantida em frasco âmbar, a fim de evitar contato com a luminosidade.

Para o teste de suscetibilidade *in vitro*, foi realizado o teste de microdiluição em caldo, conforme o protocolo preconizado pelo documento M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standard Institute* (CLSI), adaptado para fitoterápicos. Nos testes foram empregadas nove cepas de *Sporothrix spp.* provenientes de casos clínicos de felinos com esporotricose, confirmados e estocados no Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MICVET) da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). As cepas fúngicas foram isoladas e utilizadas na forma filamentosa, através do cultivo em ágar batata dextrose e incubados a 25°C por sete dias. Com estes isolados, foram preparados inóculos fúngicos em água destilada estéril atingindo uma concentração final de 1 a 5 x 10⁶ células/ml.

O experimento foi realizado em duplicata, sendo dispensado em cada poço o inóculo previamente diluído em RPMI-1640. Os três produtos de *O. majorana* foram testados em dez diluições sucessivas nas concentrações de 40 a 0,07 mg/ml. O itraconazol foi adquirido de uma farmácia de manipulação veterinária, identificada como Farmácia Magistral, e preparado uma diluição em DMSO, sendo utilizado no presente experimento nas concentrações de 16 a 0,03 µg/ml, conforme documento do CLSI. As microplacas foram incubadas a 25°C, onde após 96 horas, foi executada a leitura visual da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Posteriormente, foi feita a avaliação da Concentração Fungicida Mínima (CFM) através da semeadura de uma alíquota de 10 µl de cada poço das microplacas em ágar *Sabouraud* acrescido de Cloranfenicol, e incubadas a 25°C por 72 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados demonstraram que a infusão e o decocto não apresentaram atividade fungistática e fungicida nas concentrações testadas contra os isolados fúngicos (CIM e CFM >40 mg/ml), entretanto, o óleo essencial de manjerona apresentou atividade fungistática (CIM ≤0,06 a 0,2 mg/ml) e fungicida (CFM de ≤0,06 a 4,5 mg/ml). Nos testes realizados com o Itraconazol, obtivemos uma variação na CIM de 0,25 a >16 mg/ml, e na CFM de 4 a >16 mg/ml, o que nos demonstra a resistência de algumas cepas a essas concentrações utilizadas (Tabela 1).

Tabela 1 – Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos de infusão, decocto e óleo essencial de *Origanum majorana* (mg/ml) e de Itraconazol (µg/ml) contra nove isolados felinos do Complexo *Sporothrix spp.*

<i>Sporothrix</i> spp.	Manjerona (<i>Origanum majorana</i>)						Itraconazol	
	Infusão		Decocto		Óleo essencial		CIM	CFM
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM		
Isolado 1	>40	>40	>40	>40	0,15	0,31	0,5	4
Isolado 2	>40	>40	>40	>40	≤0,06	≤0,06	0,25	8
Isolado 3	>40	>40	>40	>40	≤0,06	≤0,06	1	>16
Isolado 4	>40	>40	>40	>40	0,2	4,5	1	8
Isolado 5	>40	>40	>40	>40	0,1	0,1	>16	>16

Isolado 6	>40	>40	>40	>40	≤0,06	1,1	0,5	>16
Isolado 7	>40	>40	>40	>40	0,5	0,5	>16	>16
Isolado 8	>40	>40	>40	>40	0,1	0,1	2	>16
Isolado 9	>40	>40	>40	>40	≤0,06	0,1	>16	>16

Os resultados obtidos com o óleo essencial foram bastante promissores, pois os isolados que foram resistentes ao Itraconazol apresentaram suscetibilidade ao óleo, o que demonstra que a manjerona tem potencial anti-*Sporothrix* spp. Este trabalho corrobora com o que relatou BARRATA et al. (1998), o qual cita que a atividade de algumas plantas aromáticas da família Lamiaceae vem sendo muito estudada pela exibição de atividade antimicrobiana de seus extratos em baixas concentrações, o que foi observado no presente estudo a partir do óleo essencial de *Origanum majorana*. Todos os isolados do Complexo *Sporothrix* spp. foram sensíveis ao óleo essencial da manjerona, que demonstrou uma variação na CIM e na CFM de ≤0,06 a 4,5 mg/ml. Acredita-se que essa variação de concentrações esteja atribuída à suscetibilidade das diferentes espécies pertencentes ao Complexo *Sporothrix* spp., os quais são identificados somente através de biologia molecular (CRUZ, 2003; MARIMON et al., 2007), que não foi realizada no presente estudo. A ação do óleo essencial de manjerona pode ser explicada por possuir em sua composição compostos fenólicos, como o timol e carvacrol (FELTROW; ÁVILA, 2000), entretanto, não é possível concluir a associação destes compostos à atividade anti-*Sporothrix* spp., devido à não realização de análise química do óleo essencial.

Devido à ausência de relatos da eficácia da manjerona em cepas do Complexo *Sporothrix* spp., os resultados do presente trabalho demonstraram pela primeira vez a atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* do óleo essencial de manjerona. Dentre os escassos trabalhos envolvendo plantas contra estes fungos, citam-se os óleos essenciais de orégano (*Origanum vulgare*) (CLEFF et al., 2008) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*) (LUQMAN et al., 2007). Em um estudo conduzido com óleo essencial de manjerona, foi demonstrada sua atividade antifúngica contra cepas de *Malassezia pachydermatis* (SANTIN, 2013).

Entretanto, testes ainda devem ser realizados para confirmar sua eficácia e segurança *in vivo*, a fim de viabilizar comercialmente o uso dessa planta como matéria prima de medicamentos para o tratamento da esporotricose.

4. CONCLUSÕES

A manjerona (*Origanum majorana*) apresentou atividade antifúngica *in vitro* sobre a forma de óleo essencial contra todas as cepas do Complexo *Sporothrix* spp. isoladas de felinos com esporotricose, demonstrando potencial anti-*Sporothrix* spp. Entretanto, os extratos aquosos de infusão e decocto não conferiram atividade anti-*Sporothrix* spp. nas concentrações testadas. Visto a relevância científica inédita, o estudo contribuiu para a busca de novas fontes que possam vir a ser utilizadas terapêuticamente, o qual requer a realização de maiores testes para melhor compreensão da ação dos produtos desta planta e assegurar sua segurança *in vivo*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARATTA, M. T., DORMAN, H. D., DEANS, S. G., BIONDI, D. M., & RUBERTO, G. (1998). Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of laurel, sage, rosemary, oregano and coriander essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, n.6, p.618-627, 1998.

BUSATTA, C. **Caracterização Química e Atividade Antimicrobiana *in vitro* e em Alimentos dos Extratos de Orégano e Manjerona**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos), URI, Erechim.

CALIXTO, J.B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e cultura**. v.55, no.3, p.37-39, 2003.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M; SCHUCH, L.F.D.; RODRIGUES, M.R.A.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix schenckii*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.60, n.2, p.513-516, 2008.

CRUZ, L.H.C.. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**. v.20, p.08 – 28. 2013.

DONADEL, K.M.; REINOSO, Y.D.; OLIVEIRA, J.C. & AZULAY, R.D.. Esporotricose: revisão. **Anais Brasileiro de Dermatologia**. n.68, p.45-52, 1993.

FELTROW, C.W.; ÁVILA, J.R.. **Manual de Medicina alternativa para o profissional de saúde**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MADRID, I.M.; SANTOS JÚNIOR, D.P.; SAMPAIO JÚNIOR, D.P.; MUELLER, E.N.; DUTRA, D.; NOBRE, M.O. & MEIRELES, M.C.A.. Esporotricose canina: relato de três casos. **Acta Scientiae Veterinariae**. v.35, p.105-108, 2007.

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G. R.; DAROKAR, M. P.; KALRA, A. & KHANUJA, S. P. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Alternative Therapies in Health and Medicine**. V. 13, n. 5, p. 54, 2007

MARIMOM, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M. & GUARRO, J.. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 45, n. 10. 2007.

SANTIN, R.. **Potencial Antifúngico e Toxicidades de óleos essenciais da Família Lamiaceae**. 2013. 106f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós – Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SCHUBACH T.M.P.; SCHUBACH, A.O.; KAMOTO BARROS, T.M.B.L et al. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p.1623-1629, 2004.

SILVA, M.G.F. da; **Atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcoólicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjerição (*Origanum basilicum* L.)**. 2011. 70f. Monografia (Bacharelado em química). Universidade Tecnológica Federal do Paraná.