

ATIVIDADE *IN VITRO* DE *Rosmarinus officinalis* FRENTE A CEPAS DO COMPLEXO *Sporothrix* sp.

CAMILA AMARAL D'AVILA¹; STEFANIE BRESSAN WALLER²; ISABEL MARTINS MADRID³; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO⁴; RENATA DE OSÓRIO FARIAS⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas - camila.amaral.davila@hormail.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 que atinge o homem e várias espécies animais, sendo causada por fungos do Complexo *Sporothrix* spp. Antigamente, acreditava-se que a espécie causadora da esporotricose era apenas *Sporothrix schenckii*, entretanto, estudos de seqüenciamento de genes demonstraram que o agente faz parte de um complexo de espécies patogênicas, tais como *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. globosa*, *S. albicans* e *S. luriei* (NEVES et al., 2012).

A enfermidade ocorre através da transmissão direta dos conídios fúngicos por inoculação traumática a partir de materiais contaminados. Clinicamente, as lesões caracterizam-se por formações circulares, elevadas, com alopecia e crostas, em grande número e com ulceração central (SCOTT et al., 1996). O fungo está presente no solo, em cascas de árvores, plantas, espinhos, musgos, palhas, madeiras e em matéria orgânica em decomposição (MADRID et al., 2010). A presença cada vez mais freqüente do felino como animal de companhia favorece a transmissão da esporotricose a partir do animal portador do *Sporothrix* spp, sendo que nos últimos anos têm crescido os casos zoonóticos envolvendo felinos domésticos, principalmente machos e não castrados (SCHUBACH et al., 2001).

Como opção terapêutica eficaz para tratamento da esporotricose, preconiza-se o uso do itraconazol, por ser um antifúngico eficaz com menos efeitos colaterais em relação aos demais antifúngicos disponíveis (SCHUBACH et al., 2001). O tratamento é sistêmico de longa duração, pelo período mínimo de três meses, mantendo-se a terapia por um mês após a cura clínica (SCOTT et al., 1996). Porém, o uso do itraconazol de forma incorreta, assim como as demais drogas antifúngicas, pode favorecer o surgimento de cepas resistentes (MARIMON et al., 2008).

Assim, alternativas terapêuticas têm sido buscadas para o tratamento da enfermidade, sendo de grande interesse científico os produtos de origem vegetal, devido à grande diversidade de flora existente no Brasil, tal como observado na planta *Rosmarinus officinalis* (alecrim), pertencente à família *Lamiaceae*, de comprovada ação antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001). O alecrim possui propriedades antissépticas para as vias aéreas, antidepressivo e calmante (ARAÚJO et al., 2004) e seus estudos em fungos patogênicos concentram-se em espécies do gênero *Candida* sp. (LIMA et al., 2006).

Os estudos do *R. officinalis* frente aos fungos do Complexo *Sporothrix* são escassos (LUQMAN et al., 2007). O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* de extratos aquosos de alecrim na forma de infusão e de decocção, bem como do óleo essencial contra cepas do Complexo *Sporothrix* spp. isoladas de casos clínicos de felinos com esporotricose.

2. METODOLOGIA

Para a preparação dos extratos aquosos, as partes aéreas do *Rosmarinus officinalis* utilizadas no trabalho foram obtidas de distribuidor comercial com certificação de origem (Luar Sul®). A infusão foi preparada a partir das folhas do alecrim acondicionadas em água fervente por 10 minutos, ao passo que o decocto foi preparado a partir do acondicionamento das partes aéreas em água destilada estéril à temperatura ambiente e, posteriormente, submetido ao aquecimento e mantido em ebulição durante 10 minutos. Após, as amostras foram filtradas em papel filtro Whatmann n° 1 para eliminação de resíduos sólidos. Por sua vez, o óleo essencial utilizado foi obtido comercialmente (Ferquima®) e acondicionado em frasco âmbar e mantido em local fresco sem exposição solar.

Para o experimento, foram utilizadas nove cepas do Complexo *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).

Os testes *in vitro* foram realizados através da técnica de Microdiluição em Caldo conforme o documento M38-A2 para fungos filamentosos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Os extratos aquosos foram testados nas concentrações de 40 a 0,07 mg/ml e o óleo essencial nas concentrações de 36 a 0,07 mg/ml. Para fim comparativo, as cepas fúngicas foram testadas frente ao medicamento itraconazol, obtido através de uma farmácia comercial de manipulação local sendo preparado uma diluição em DMSO e testado nas concentrações 16 a 0,03 µg/ml, conforme o protocolo do CLSI.

Os isolados clínicos foram utilizados na forma filamentosa, através do cultivo em ágar batata dextrose e incubados a 25°C por sete dias. Posteriormente, inóculos fúngicos foram preparados 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. 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 os extratos aquosos de infusão e decocção não apresentaram atividade antifúngica *in vitro* nas concentrações testadas, com valores de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) superior a 40 mg/ml. Entretanto, o óleo essencial de alecrim obteve atividade fungistática e fungicida para todos os isolados fúngicos, cujos valores de CIM variaram de ≤0,06 a 1 mg/ml e os valores de CFM variaram de ≤0,06 a 4,3 mg/ml (Tabela 1).

Tabela 1. Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) de infusão, decocção e óleo essencial (mg/ml) de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e de itraconazol ($\mu\text{g/ml}$) contra nove cepas do Complexo *Sporothrix* spp. isoladas de felinos com esporotricose.

Complexo <i>Sporothrix</i> sp.	Alecrim (<i>Rosmarinus officinalis</i>)						Itraconazol	
	Infusão		Decocção		Óleo essencial		CIM	CFM
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM		
Isolado 1	>40	>40	>40	>40	0,31	1,25	0,5	4
Isolado 2	>40	>40	>40	>40	0,2	2,1	1	>16
Isolado 3	>40	>40	>40	>40	0,5	4,3	1	8
Isolado 4	>40	>40	>40	>40	0,1	2,1	>16	>16
Isolado 5	>40	>40	>40	>40	$\leq 0,06$	$\leq 0,06$	0,25	8
Isolado 6	>40	>40	>40	>40	0,5	4,3	0,5	>16
Isolado 7	>40	>40	>40	>40	1	2,1	>16	>16
Isolado 8	>40	>40	>40	>40	0,1	2,1	2	>16
Isolado 9	>40	>40	>40	>40	$\leq 0,06$	2,1	>16	>16

Observa-se, então, que os extratos na forma aquosa não tiveram o efeito desejado nas concentrações testadas, o que pode ser decorrente da baixa concentração do princípio ativo na infusão e decocção em relação à concentração do mesmo no óleo essencial ou ainda à falta de algum princípio ativo que não seja solúvel em água (SILVA et al., 2009). Este fato pode ser comprovado através de análise química e identificação dos compostos presentes, o qual ainda não foi realizado. A notória atividade fungistática e fungicida observada no óleo essencial de alecrim sobre os isolados fúngicos do Complexo *Sporothrix* spp. pode ser explicado, segundo Silva (2006), pelas elevadas concentrações dos princípios ativos nos óleos em relação aos extratos aquosos. No entanto, pode ter ocorrido ineficiência do conteúdo dos extratos aquosos por baixa concentração ou perda de algum princípio ativo na presença de calor exigido para realização do extrato aquoso de infusão e decocção (SILVA et al., 2009).

No presente trabalho, foram encontrados valores de CIM que variaram de $\leq 0,06$ a 1 mg/ml, valores semelhantes ao encontrado na literatura por Luqman et al. (2007), que testou a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de alecrim e obteve valores frente ao *S. schenckii* de CIM de 11 mg/ml. Além disso, foi verificada incipiente atividade antifúngica do óleo essencial do *R. officinalis* a 8%, com halo de inibição de 10 mm, para cepas de *C. albicans* (LIMA et al., 2006). Resultados semelhantes também foram observados por Araújo (2004), que avaliaram a atividade antifúngica frente cepas de *Candida* do óleo essencial dessa planta. O óleo essencial do alecrim é antibacteriano e antisséptico e possui capacidade de inibir o crescimento de varias bactérias e fungos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e álcoois (SIMÕES et al., 2004). Diferentes extratos já foram testados com comprovada atividade antimicrobiana, como o extrato etanólico de alecrim frente ao *Clostridium perfringes*, que apresentou efeito antibacteriano em teste *in vitro* de microdiluição em caldo (LUCARINI et al., 2008).

Em relação ao itraconazol, que é antifúngico de eleição para tratamento da esporotricose, os valores de CIM variaram de 0,25 a >16 mg/ml e os de CFM variaram de 4 a >16 mg/ml. Os isolados apresentaram diferentes valores de CIM e CFM, exceto para três isolados felinos (isolados nº 4, 7 e 9), que obtiveram os mesmos valores de CIM e CFM, não demonstrando suscetibilidade *in vitro* ao medicamento nas concentrações testadas, com valores de CIM e CFM superior a

16 µg/ml, o que demonstra a possibilidade de haver resistência *in vitro* entre as cepas. Estes mesmos isolados apresentaram-se sensíveis ao óleo essencial de alecrim, com valores de CIM de $\leq 0,06$ a 1 mg/ml e de CFM de 2,1 mg/ml, demonstrando que o óleo tem potencial antifúngico *in vitro*, merecendo maiores estudos para confirmar sua segurança no tratamento e avaliar seus possíveis efeitos colaterais através de testes de toxicidade, entre outros. Os efeitos adversos e a resistência estabelecida aos antifúngicos de uso tradicional possibilita o uso de extratos vegetais e representa inúmeras vantagens, principalmente tratando-se de produtos naturais com mecanismo de ação ativos contra os patógenos, o que possibilita servir de opção terapêutica para estes quadros (ANDRADE, 2008).

4. CONCLUSÕES

Dentre os extratos estudados, o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentou importante atividade fungicida e fungistática *in vitro* contra cepas do Complexo *Sporothrix* spp., podendo vir a ser uma opção anti-*Sporothrix* spp. Os extratos aquosos na forma de infusão e decocto não apresentaram ação antifúngica. Maiores estudos acerca da toxicidade da planta, bem como eficácia *in vivo* devem ser realizados, a fim de obter maior conhecimento e segurança do uso desta planta para fins medicinais no tratamento da esporotricose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, SF. **Manual de terapêutica veterinária**. São Paulo, Roca, 2008.

ARAÚJO, J. C. L. V. *et al.* Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v.33, n.1, p.55-64, 2004.

LAMBERT R. J. W. *et al.* A Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal for Applied Microbiology**, Oxford, v.91, n.3, p.453-462, 2001.

LIMA, I. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de Candida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.2, p.197-201, 2006.

LUCARINI R. Extratos brutos de alecrim como potencial agente antibacteriano frente ao clostridium perfringes. In: **31ª Reunião anual da sociedade brasileira de química**, Águas de Lindoia, 2008. Anais... Águas de Lindoia: Sociedade Brasileira de Química, 2008.

LUQMAN, S. *et al.* Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, Aliso Viejo, v.13, n.5, p.54-59, 2007.

MADRID, I.M *et al.* Feline sporotrichosis in the Southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, Berlim, v.57, n.2, p.151-154, 2010.

FERRÁDIZ, M. J. *et al.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 49(11):48==11. DOI: 10.1128/AAC.49.11.4811-4813.2008.

NEVES, L. V. *et al.* Avaliação "in vitro" da Suscetibilidade das Novas Espécies de Sporothrix Frente a Antifúngicos. **Mychopatologia**, Rio de Janeiro. v.4, n.2, p.spe, 2012.

SCHUBACH, T. M. P. et al. *Sporothrix schenckii* isolated from domestic cats with and without sporotrichosis. **Mycopathologia**, Rio de Janeiro, v.153, n.2, p.83-86, 2001.

SCOTT, D. W. et al. **Dermatologia de Pequenos Animais**, Rio de Janeiro: Interlivros, 1996.

SILVA, A. C. et al. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. **Ciências e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n.spe, p.1853-1860, 2009 .

SILVA, G. S. Substâncias naturais: uma alternativa para o controle de doenças. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v.31, n.5, p.9, 2006.

SIMÕES C. M. O. et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Florianópolis: UFRGS, 2004.