

## **RESISTÊNCIA *IN VITRO* DE *Sporothrix brasiliensis* ISOLADO DE CÃES E GATOS AO ITRACONAZOL E SUA SENSIBILIDADE FRENTE AO *Origanum majorana* L.**

**STEFANIE BRESSAN WALLER<sup>1</sup>; ISABEL MARTINS MADRID<sup>2</sup>; MARLETE BRUM CLEFF<sup>3</sup>; RENATA OSÓRIO DE FARIA<sup>4</sup>; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO<sup>5</sup>; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES<sup>6</sup>**

<sup>1</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – [waller.stefanie@yahoo.com.br](mailto:waller.stefanie@yahoo.com.br)

<sup>2</sup> Centro de Controle de Zoonoses, Prefeitura Municipal de Pelotas – [imadrid\\_rs@yahoo.com.br](mailto:imadrid_rs@yahoo.com.br)

<sup>3</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – [emebrum@bol.com.br](mailto:emebrum@bol.com.br)

<sup>4</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – [renataosorio@ig.com.br](mailto:renataosorio@ig.com.br)

<sup>5</sup> Universidade Federal do Rio Grande do Sul – [jmello@gabinete.ufrgs.br](mailto:jmello@gabinete.ufrgs.br)

<sup>6</sup> Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas – [meireles@ufpel.edu.br](mailto:meireles@ufpel.edu.br)

### **1. INTRODUÇÃO**

A esporotricose é uma micose zoonótica de ocorrência mundial causada por espécies fúngicas do Complexo *Sporothrix* (MARIMON et al., 2008). No Brasil, *S. brasiliensis* é considerada a espécie mais virulenta e com alta prevalência, sendo geograficamente restrita a este país (RODRIGUES et al., 2013). Itraconazol é considerado o antifúngico de eleição (LARSSON, 2011), entretanto, o surgimento de cepas de *Sporothrix* sp. resistentes tem sido observado, devido ao uso indiscriminado de fármacos (CHAVES et al., 2013).

Diante da necessidade em buscar novos compostos químicos com atividade antifúngica, estudos científicos têm pesquisado plantas medicinais como fontes promissoras, entre os quais têm se destacado as plantas da família Lamiaceae,

manjerona (*Origanum majorana* L., família Lamiaceae), com atividade antifúngica comprovada em seu óleo essencial contra *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Trichophyton* sp., *Microsporum* sp. (SOUZA et al., 2010). No entanto, não há estudos frente a fungos causadores da esporotricose e, diante disso, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Origanum majorana* L. frente ao *Sporothrix brasiliensis* e analisar sua constituição química.

### **2. METODOLOGIA**

O óleo essencial de *O. majorana* L. foi adquirido comercialmente (Ferquima® – Indústria e Comércio Ltda, Vargem Grande Paulista/SP, Brasil) com certificado botânico e de origem do Egito. A análise química foi realizada em cromatografia gasosa de alta-resolução com detector de ionização em chama (CG-FID) em equipamento HP 7820A (Agilent®) e os dados gerados em programa de computador EZChrom Elite Compact®.

Quatorze isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* oriundos de cães (*n*: 6) e gatos (*n*: 8) da região de Pelotas foram utilizados, todos provenientes da micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MICVET), da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Todos os isolados foram caracterizados quanto à espécie no Laboratório de Micologia Médica e Molecular, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), através de análise de reação em cadeia da polimerase, por polimorfismo no comprimento de fragmentos de restrição (PCR-RFLP), de acordo com RODRIGUES et al. (2014).

Para o teste de suscetibilidade antifúngica, foi utilizada a técnica de microdiluição em caldo, segundo as diretrizes do documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008a), adaptado para o uso do óleo essencial, o qual foi testado nas concentrações de 72 a 2.25 mg/mL. Itraconazol comercial de uso veterinário foi testado nas concentrações de 16 a 0.0313 µg/mL. Os resultados foram expressos em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). A análise de variância e comparação das médias geométricas dos dados foram preconizadas pelo teste de Tukey através do programa estatístico BioEstat® (versão 5.3), com valor  $p < 0.05$  de significância.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados da atividade fungistática e fungicida do itraconazol e do óleo essencial de *O. majorana* L. frente ao *S. brasiliensis* isolados de cães e gatos com esporotricose estão resumidos na Tabela 1.

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do itraconazol (µg/mL) e do óleo essencial de *Origanum majorana* L. (mg/mL) frente a isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* oriundos de cães e gatos com esporotricose.

Produto testado		<i>Sporothrix brasiliensis</i>					
		Cão (n: 6)		Gato (n: 8)		Total (n: 14)	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ITZ <sup>x</sup>	V*	0.5-8	1->16	≤0.03->16	0.25->16	≤0.03->16	0.25->16
	50%	1	2	2	2	2	2
	90%	2	16	16	>16	16	>16
MNJ <sup>†</sup>	V*	≤2.25-4.5	≤2.25-18	≤2.25-9	≤2.25-9	≤2.25-9	≤2.25-18
	50%	≤2.25	4.5	≤2.25	4.5	≤2.25	4.5
	90%	≤2.25	9	4.5	9	4.5	9

V\* - variação de concentrações; ITZ<sup>x</sup> - itraconazol; MNJ<sup>†</sup> - manjerona.

Todos os isolados clínicos de *S. brasiliensis* foram sensíveis ao itraconazol (100% - 14/14), demonstrando atividade fungistática em todas concentrações testadas; no entanto atividade fungicida foi demonstrada em apenas 78.6% (11/14) dos isolados. Embora não exista um ponto de corte que estabeleça os valores referentes à sensibilidade e à resistência *in vitro*, o documento M38-A2 (CLSI, 2008b) sugere que os valores de CIM ≥ 4 µg/mL para o itraconazol possam ser considerados resistentes. Diante deste proposto, um isolado canino e dois felinos foram resistentes, onde o itraconazol não demonstrou atividade fungistática.

Em um estudo avaliando a suscetibilidade de 23 isolados de *S. brasiliensis* frente ao itraconazol, MARIMON et al. (2008) demonstraram que a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram 0.5 µg/mL e 2 µg/mL, respectivamente. No presente estudo, os valores para o total de isolados clínicos da região foram 2 µg/mL e 16 µg/mL, respectivamente, sendo estas concentrações 4 a 8x superiores aos encontrados por MARIMON et al. (2008), o que reflete na maior virulência dos *S. brasiliensis* isolados na região sul do Brasil. Os resultados alertam para a existência de patógenos fúngicos resistentes ao itraconazol, os quais ocasionam a permanência do patógeno no hospedeiro, dificultando o sucesso terapêutico.

Em relação ao óleo essencial de *O. majorana* L., observou-se que este apresentou atividade fungistática (CIM entre ≤2.25 a 9 mg/mL) e fungicida (CFM entre ≤2.25 a 18 mg/mL) em 100% (14/14) dos *S. brasiliensis* testados, inclusive sobre aqueles isolados clínicos resistentes ao itraconazol. Embora não existam

dados da atividade do óleo essencial de *O. majorana* L. contra fungos causadores da esporotricose, SOUZA et al. (2010) demonstraram atividade antifúngica desta planta a 160 µL/mL, inclusive sobre fungos patogênicos resistentes aos antifúngicos convencionais.

No cromatograma do extrato, foram identificados 22 compostos químicos, sendo 1,8-cineol majoritário com 20.9% de concentração, seguido de 4-terpineol (20.4%), γ-terpineno (8.5%), p-cimeno (7.0%), sabineno (6.7%), limoneno (5.3%), entre outros. Segundo KURECKI et al. (2013), esses compostos, como α-terpineno, cineol e terpinen-4-ol, apresentaram atividade antimicrobiana quando testados isoladamente. O mecanismo da atividade do óleo de *O. majorana* L. pode estar relacionado com a degeneração da parede celular fúngica (SOUZA et al., 2010), entretanto, outros mecanismos possam expressar atividade anti-*Sporothrix* sp.

A composição química assemelha-se aos descritos científicos (BUSATTA et al., 2008; SFEIR et al., 2013), entretanto, a composição majoritária difere do relatado por MARINO et al. (2001), que encontraram predominantemente os compostos timol e carvacrol no óleo de *O. majorana* L. analisado. Segundo PRINS et al. (2006), a diferença na composição química entre plantas de mesma espécie ocorre devido aos fatores relacionados ao cultivo da planta, como área geográfica, sazonalidade, clima, entre outros.

#### 4. CONCLUSÕES

Os isolados clínicos de *S. brasiliensis* apresentaram alta resistência *in vitro* quando testados frente ao itraconazol, no entanto, todos os isolados foram sensíveis ao óleo essencial de *Origanum majorana* L. A atividade antifúngica da planta possivelmente está relacionada à presença dos compostos terpenóides prevalentes, como 1,8-cineol e 4-terpineol. A promissora atividade desta planta frente a isolados resistentes encoraja maiores estudos no que concerne ao mecanismo de ação sobre a célula fúngica, bem como análise do potencial tóxico, a fim de verificar a segurança de seu uso como fitoterápico.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BUSATTA, C.; VIDAL, R.S.; POPIOLSKI, A.K.; MOSSI, A.J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M.R.A.; CORAZZA, F.C.; OLIVEIRA, V.J.; CANSIAN, R.L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v.25, p. 207-211, 2008.

CHAVES, A.R.; CAMPOS, M.P.; BARROS, M.B.L.; CARMO, C.N.; GREMIÃO, I.D.F.; PEREIRA, S.A.; SCHUBACH, T.M.P. Treatment abandonment in feline sporotrichosis – study of 147 cases. **Zoonoses and Public Health**, v.60, p.149-153, 2013.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27-A3 Guideline.** Approved Standard – 3<sup>th</sup> Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008b. 2008a.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing for filamentous fungi: approved**

**standard. Document M38-A2.** Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2008b.

KUREKCI, C.; PADMANABHA, J.; BISHOP-HURLEY, S.L.; HASSAN, E.; AL-JASSIM, R.A.; McSWEENEY, C.S. Antimicrobial activity of essential oils and five terpenoid compounds against *Campylobacter jejuni* in pure and mixed culture experiments. **International Journal of Food Microbiology**, v. 166, n. 3, p.450-457, 2013.

LARSSON, C.E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GÉNE, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix schenckii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p. 732-734, 2008.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. **International Journal of Food Microbiology**, v. 67, p. 187-195, 2001.

PRINS, C.L.; LEMOS, C.L.S.; FREITAS, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 4, p. 92-95, 2006.

RODRIGUES, A.M.; DE MELO, T.M.; DE HOOG, G.S.; SCHUBACH, T.M.P., PEREIRA, A.S.; FERNANDES, G.F.; BEZERRA, L.M.L.; FELIPE, M.S.; DE CAMARGO, Z.P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 7:e2281, 2013.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.S.; CAMARGO, Z.P. Genotyping species of the *Sporothrix schenckii* Complex by PCR-RFLP of calmodulin. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78, p. 383–387, 2014b.

SFEIR, J.; LEFRANÇOIS, C.; BAUDOUX, D.; DERBRÉ, S.; LICZNAR, P. *In vitro* antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Article ID 269161, 9 pages, 2013.

SOUZA, N.A.B.; LIMA, E.O.; GUEDES, D.N.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; SOUSA, F.B. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 46, n. 3, p. 499-508, 2010.