

ATIVIDADE *in vitro* DE *Olea europaea* FRENTE A FUNGOS DO GÊNERO *Microsporium*

MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL¹; ANNA LUIZA SILVA²; EMANOELE FIGUEIREDO
SERRA³; STEFANIE BRESSAN WALLER⁴; JOÃO ROBERTO BRAGA DE
MELLO⁵; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁶

¹Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – marciaripoll@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) – annavet@live.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) – emanoele.serra@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) – waller.stefanie@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) – jmello@gabinete.ufrgs.com

⁶Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) – renataosoriovet@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Comumente conhecida como oliveira, a *Olea europaea* é a única espécie da família das *Oleaceae* a produzir fruto comestível, a azeitona, do qual se extrai o óleo de oliva. É considerado um dos cultivos mais antigos, datando de três a quatro mil anos a.C. Originária da Palestina, a olivicultura está comercialmente presente na América do Sul, e em especial em países que estruturam o bloco do Mercosul, com destaque para Argentina, Brasil e Uruguai. Considerado terceiro maior importador e sexto maior consumidor de acordo com o *International Olive Oil Council* (2009), o Brasil possui ênfase de produção nas regiões Sul e Sudeste. (COUTINHO 2015).

O sul do Brasil possui fator climático que contribui para o cultivo de oliveiras, posto que a planta têm boas condições de crescimento com temperaturas variando entre 10°C e 30°C, variações que ficam de acordo com a temperatura média anual no Rio Grande do Sul, que tramita entre 17°C e 24°C (PILLAR et al., 2009; COUTINHO, 2009).

Os vegetais produzem dois tipos de metabólitos denominados primário e secundário, o primeiro equivale à sobrevivência da planta, já o secundário corresponde a defesa. Esses metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos: compostos terpênicos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos (TAYZ & ZEIGER, 2004). A composição de fenóis varia entre os extratos, de acordo com estudos recentes, o composto majoritariamente encontrado em extratos de oliveira é a oleuropeína (MELLO, 2012).

Dentre as terapias fúngicas utilizadas encontram-se fármacos como itraconazol, anfotericina B, cetoconazol, terbinafina e iodeto de potássio. Recentes estudos tem revelado a resistência de cepas a tratamento com os principais antifúngicos devido ao seu uso indiscriminado (NOBRE et al., 2002; ODDS et al., 2003). A partir dessas informações procuram-se alternativas para auxiliar no tratamento dessas afecções, obtendo-se nas plantas e extratos eficientes fontes no combate a afecções por micro-organismos como demonstrado em estudos realizados com fungos e bactérias (SUDJANA et al., 2009; KORUKLUOGLU, et al., 2006).

Os dermatófitos são organismos capazes de metabolizar queratina e transforma-la em nutrientes, fazem parte das numerosas espécies fúngicas patogênicas/opportunistas e podem parasitar humanos e animais. Classificados como organismos filamentosos, as dermatofitoses desenvolvem lesões de forma centrífuga, e a partir da produção de metabólitos tóxicos desenvolvem uma reação inflamatória a partir da invasão do extrato córneo. São divididos em três

gêneros, os *Microsporium*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, suas diferenciações se dão a partir da macro e microscopia (CRUZ, 1985; LARONE, 2011).

Com intuito de observar a atividade do azeite comercial frente a fungos do gênero *Microsporium* foram realizados testes *in vitro* a fim de testar a atividade, seja fungicida ou fungistática, na prerrogativa de utilizar esses produtos de maneira a auxiliar o tratamento terapêutico dessas micoses.

2. METODOLOGIA

Foram testados dois azeites comerciais de diversos cultivares obtido através de distribuidora com certificado de registro e envasados em frasco âmbar selado com papel alumínio, protegidos da luz, identificados como azeite A e azeite B. Foram utilizados isolados do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MicVet – UFPEL), deles três *Microsporium canis*, um *Microsporium nanum* e um *Microsporium gypseum*. Isolados de caninos e felinos que manifestaram clinicamente a doença.

Para o teste de sensibilidade *in vitro*, realizou-se a técnica de microdiluição em caldo, com base no documento M38-A3 para fungos filamentosos do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), utilizando-se adaptações para produtos químicos (NCCLS, 2002). Para utilização dos azeites comerciais de *O. europaea* L., foram testados diluições em dez vezes, sucessivas, variando a concentração de 250mg/ml a 0,48mg/ml. Essas concentrações foram previamente diluídas em meio sabouraud liquido acrescido de cloranfenicol. Todos os testes foram realizados em triplicata em microplacas de 96 poços de fundo chato. Na coluna nº 1 das microplacas colocou-se o controle positivo e na coluna nº 12 foi disposto o controle negativo, com a finalidade de evidenciar a esterilidade do meio de cultura e produto testado. Em seguida, colocou-se 100 µl do produto testado no poço nº 2, e realizou-se a diluição do mesmo ao longo dos poços, na sequencia adicionou-se 100 µl de inóculo diluído em sabouraud liquido acrescido de cloranfenicol. A microplacas foram incubadas durante 96h na temperatura de 35°C até a leitura da concentração inibitória mínima (CIM), onde os produtos que inibiram o crescimento fúngico são colocados em placas para definição da concentração fungicida mínima (CFM), em que avalia-se através da semeadura de 10 µl dos poços de microdiluição em placas de petri contendo agar sadouraud dextrose acrescido de cloranfenicol onde se observa se há crescimento em até 7 dias.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os azeites comerciais A e B não obtiveram resultados fungicidas e fungistáticos frente a fungos do gênero *Microsporium* utilizados no estudo, o que vem de encontro com estudos de Korukluoglu et al. (2006) que observou atividade *in vitro* de extratos de folhas de oliveira frente a fungos leveduriformes. Possivelmente os resultados não foram semelhantes devido a grande variação na composição de azeite e extratos da oliveira, em que as concentrações de compostos fenólicos podem ter muitas mudanças e diferentes concentrações das substância (MELLO, 2012). Outra variável significativa é o microorganismo trabalhado, no estudo realizado por Packer (2006) o extrato da folha de *Olea europaea* obteve halo de inibição frente as ATCC's de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* que são bactérias, microorganismos unicelularis e procarióticas, diferente dos fungos que são eucarióticos, e no caso dos filamentosos, pluricelulares, a diferença de estrutura faz com que as bactérias sejam mais



sensíveis. E em outro estudo realizado por Sudjana et al. (2009), foi observado ação frente a leveduras do gênero *Candida* e bactérias como *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia marcescens*, constatando que o microorganismo mais suscetível dentre os testados foi *Campylobacter jejuni*, porém os citados anteriormente também apresentaram certo grau de inibição. Possivelmente essa diferença de resultados dê-se pelo extrato utilizado somado ao tipo de microorganismo testado.

4. CONCLUSÕES

Através o trabalho pode-se observar que o azeite comercial de duas diferentes marcas não possui atividade antifúngica ou fungistática frente a fungos do gênero *Microsporum*, porém espera-se que em futuros teste de diferentes extratos de *O. europaea*, seja possível a obtenção de resultados positivos e seja observada atividade frente à esses fungos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

COUTINHO, E. F., JORGE, R. O., HAERTER, J. A., COSTA, V. B. **Oliveira: Aspectos técnicos e cultivo no Sul do Brasil**. EMBRAPA, Brasília – DF, 2015.

COUTINHO, E. F., RIBEIRO, F. C., CAPPELLARO, T. H. **Cultivo de Oliveira (*Olea europaea* L.)**. Pelotas – RS, 2009.

CRUZ, L. C. H. **Micologia Veterinária**. 1ª Edição, Itaguaí – RJ, Universitária UFRRJ, 1985.

KORUKLUOGLU, M., SAHAN, Y., YIGIT, A., KARAKAS, R. **Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye region of Turkey**. Ann Microbiol 56:359–362, 2006.

LARONE, D. H. **Medically important fungi: a guide to identification**. Washington, DCASM, 5th Edition, Press, 2011.

MELLO, L. D., PINHEIRO, M. F. **Aspéctos físico-químicos de azeite de oliva e de folhas de oliveira provenientes de cultivares do RS, Brasil**. v. 23, n 4, p. 537-548, Araraquara, 2012.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos; **Norma Aprovada**. NCCLS document M38-A (ISBN 1-56238-470-8). 2002.

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.; FERREIRO, L. **Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais**. Ciência Rural, 32, 175-184, 2002.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. **Antifungal agents: mechanims of action**. Trends in Microbiology, 11 (6), 272-279, 2003.

PILLAR, V. P., MÜLLER, S. C., CASTILHOS, Z. M. S., JACQUES, A. V. A. **Campos Sulinos: conservação e uso sustentável da biodiversidade**. Brasília, MMA. 403 p. 2009.

SUDJANA, A. N., D'ORAZIO, C., RYAN V., RASOOL N. **Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract**. Int. J. Antimicrob. Agents, 33: 461-463, 2009.

TAIZ, L. & ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. Porto Alegre: Artmed, p.449-484, 2004.