

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix brasiliensis* ISOLADOS DE CÃES A ÓLEOS ESSENCIAIS DA FAMÍLIA LAMIACEAE

VITTÓRIA BASSI DAS NEVES¹; STEFANIE BRESSAN WALLER²; ANNA LUIZA SILVA³; MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL⁴; RENATA OSÓRIO DE FARIA⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – vick.bassi@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – waller.stefanie@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – annavet@live.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – marciaripoll@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – renataosoriovet@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

A esporotricose é uma micose subcutânea adquirida através da inoculação traumática na pele por conídios do complexo *Sporothrix schenckii* e é considerada uma zoonose, atingindo pessoas e animais através da arranhadura e mordedura de animais doentes, especialmente felinos (MEINERZ et al. 2007). A esporotricose tem se apresentado cada vez mais frequente no Brasil (CCZ/PELOTAS, 2017), e, nos últimos anos, tem sido verificado um aumento da ocorrência em cães (MADRID et al., 2007a; MADRID et al., 2007b; FILGUEIRA, 2009), sendo *Sporothrix brasiliensis* o principal agente etiológico no Brasil (MONTENEGRO et al., 2014). O fármaco de eleição para o tratamento é o itraconazol, entretanto o insucesso terapêutico no seu tratamento, com resistência e ocorrência de recidiva da doença, vem sendo relatado (HEIDRICH et al., 2011; STOPIGLIA et al., 2014).

Essa situação tem incentivado a busca por terapias alternativas que sejam fonte de novas moléculas ativas, seguras e eficazes, especialmente através de plantas medicinais (WALLER et al., 2016). Estudos recentes com extratos de vegetais da família Lamiaceae têm sido promissores contra fungos patogênicos, com poucos estudos na esporotricose (CLEFF et al., 2013; COUTO et al., 2015; WALLER et al., 2017). Esse trabalho objetivou avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais comerciais de manjerona, alecrim e orégano frente a isolados clínicos de *S. brasiliensis* oriundos de cães com esporotricose.

2. METODOLOGIA

Neste experimento foram utilizados óleos essenciais comerciais de manjerona (*Origanum majorana* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) de distribuidor comercial (Ferquima® Indústria e Comércio Ltda, São Paulo/SP, Brasil).

Para o teste de suscetibilidade antifúngica *in vitro*, 14 isolados clínicos de *S. brasiliensis* obtidos de cães com esporotricose e estocados na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária, Faculdade de Veterinária (UFPEL) foram utilizados pela técnica de microdiluição em caldo, segundo as diretrizes do protocolo M38-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (NCCLS, 2008) com adaptações para fitoterápicos. Os inóculos foram ajustados em espectrofotômetro de 530 nm e transmitância de 80 – 82%. A suspensão foi então diluída em meio RPMI-1640, tamponado com glicose a 2% e MOPS (1:50, v/v). Concentrações entre 0,07 e 36 mg/ml dos óleos essenciais foram preparadas por

diluições seriadas, utilizando meio RPMI-1640 tamponado com MOPS e acrescido de duas gotas de Tween 20 para facilitar a solubilização.

Para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM), foram utilizadas microplacas de 96 poços, onde foram acrescentadas alíquotas de 100 µl do inóculo fúngico e 100 µl do óleo essencial diluído, com controle negativo (RPMI e óleo essencial) e controle positivo (inóculo fúngico). Para fármaco de referência, utilizou-se itraconazol de uso veterinário, diluído em DMSO (dimetilsulfóxido), de acordo com as diretrizes do CLSI. As microplacas foram incubadas em equipamento de rotação do tipo shaker a 27°C por 72 horas. Foram transferidas, para placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose, alíquotas de 10 µl dos poços que não apresentaram crescimento fúngico visível, a fim de se obter a concentração fungicida mínima (CFM). Estas placas foram feitas em duplicatas e incubadas a 27°C por 72 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de suscetibilidade *in vitro*, os valores de CIM do itraconazol variaram de 0,12 a 1 µg/ml (10/14), porém, observou-se a resistência *in vitro* ao itraconazol (04/14), com valores de CIM ≥ 4 µg/ml. Segundo o que sugere o CLSI, isolados com CIM ≥ 4 µg/ml para o itraconazol, podem ser consideradas resistentes. Estes mesmos isolados se mostraram sensíveis à atividade fungistática dos três óleos testados, com valores de CIM $\leq 0,07$ mg/ml para orégano; CIM $\leq 1,12$ mg/ml para alecrim; CIM $\leq 0,28$ mg/ml para manjerona.

Os demais isolados também foram sensíveis à atividade fungicida dos óleos testados, embora não tenha sido observado em itraconazol (CFM > 32 µg/ml), o qual é reconhecido por sua boa ação fungistática. Para a manjerona, a CFM variou de $\leq 0,07$ a 4,5 mg/ml; para alecrim, variou de 0,28 e 18 mg/ml e para o orégano foi CFM $\leq 0,07$ mg/ml. De modo geral, o óleo de orégano foi o mais eficaz por inibir e causar a morte de todos os isolados nas menores concentrações (CIM e CFM $\leq 0,07$ mg/ml), conforme Tabela 1.

Tabela 1: Atividade fungistática (CIM) e fungicida (CFM) *in vitro* dos óleos essenciais de orégano, alecrim, manjerona, e itraconazol frente a *Sporothrix brasiliensis* de cães.

Isolados fúngicos	Orégano (mg/ml)		Alecrim (mg/ml)		Manjerona (mg/ml)		Itraconazol (µg/ml)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Cães (n:14)	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$ -4,5	0,28- 18	$\leq 0,07$ -2,25	$\leq 0,07$ -4,5	$\leq 0,12$ - >64	32- >64
IOC 1226 (n:1)	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$	1,12	1,12	0,14	0,28	$\leq 0,12$	>64
Total (n:15)	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$	$\leq 0,07$ -4,5	0,28- 18	$\leq 0,07$ -2,25	$\leq 0,07$ -4,5	$\leq 0,12$ - >64	32- >64

Stopiglia et al. (2014) testaram a sensibilidade *in vitro* do itraconazol frente isolados de *Sporothrix* spp., e, assim como neste estudo, observaram a ocorrência de resistência ao fármaco, o que alerta para uma maior dificuldade no controle dessa doença. Heidrich et al. (2011) observou também resistência do *Sporothrix* spp. ao itraconazol, porém em pacientes humanos portadores da micose que estavam em tratamento, observando recidiva das lesões, assim como em gatos tratados com itraconazol (Reis et al., 2016), cuja persistência das lesões demonstram a dificuldade do seu controle.

Como alternativa, os testes fitoterápicos demonstraram a sensibilidade do *S. brasiliensis* de cães ao óleo de orégano, assim como observado em isolados clínicos do Rio de Janeiro (Couto et al., 2015), onde os valores de CIM de 0,0625 a 0,5 mg/ml para *S. brasiliensis*, e entre 0,125 e 0,25 mg/ml para *S. schenckii* foram

eficazes. Embora as concentrações médias observadas por Couto et al. (2015) tenham se mostrado superiores às encontradas em nosso estudo, verifica-se nos dois experimentos a eficácia da planta, que se mostra promissora para maiores investigações. Em outros patógenos fúngicos, *Candida* sp. (Cleff et al. 2013), também foi sensível nas CIM entre 0,00065 e 0,01 mg/ml.

Estudos com a manjerona também indicaram atividade antimicrobiana, inclusive sobre bactérias resistentes a antimicrobianos (Marques et al., 2015). A atividade da manjerona sobre *S. brasiliensis* de gatos (Waller et al., 2017) também foi demonstrada, assim como em nossos isolados caninos, inclusive sobre isolados resistentes ao itraconazol. Mais estudos devem ser realizados para compreender a atividade dessa planta nessa doença.

Em experimento com o óleo essencial de alecrim, Luqman et al. (2007), testaram sua atividade diante de isolados fúngicos e bacterianos resistentes aos fármacos usuais. O extrato se mostrou eficaz, inibindo o crescimento de dermatófitos e *Candida albicans*, corroborando com os nossos resultados. Waller et al. (2017) também testaram extratos do alecrim sobre isolados de *S. brasiliensis*, não verificando porém, atividade fungistática. Isso indica que maiores estudos, a respeito da constituição dos extratos e da atividade de alguns dos seus constituintes sobre microrganismos patogênicos, devem ser conduzidos para confirmar se há boa atividade antifúngica da planta sobre isolados de *Sporothrix*.

4. CONCLUSÕES

Inúmeros estudos têm mostrado o potencial terapêutico dos extratos de *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L. frente microorganismos patogênicos, entretanto mais estudos devem ser realizados para comprovar sua eficácia *in vivo* e verificar a ausência de toxicidade destes compostos. É importante que novos experimentos sejam conduzidos, tendo em vista o aumento da ocorrência de resistência às medicações utilizadas tradicionalmente no tratamento da esporotricose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CCZ - PELOTAS/RS. **Esporotricose**. Centro de Controle de Zoonoses, Pelotas. Acessado em 29 set. 2017. Online. Disponível em: <http://www.pelotas.rs.gov.br/centro-zoonoses/zoonoses/arquivos/zoonoses-esporotricose.pdf>
- CLEFF, M. B., MADRID, I., MEINERZ, A. R., MEIRELES, M. C. A., MELLO, J. R. B., RODRIGUES, M. R., ESCAREÑO, J. J. H. Essential oils against *Candida* spp: *in vitro* antifungal activity of *Origanum vulgare*. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 20, p. 2245-2250, 2013.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. 3 ed. Wayne: M38-A2 CLSI; p 144, 2008.
- COUTO, C. S. F., RAPOSO, N. R. B., ROZENTAL, S., BORBA-SANTOS, L. P., BEZERRA, L. M. L., ALMEIDA, P. A., BRANDÃO, M. A. F. Chemical Composition and Antifungal Properties of Essencial Oil of *Origanum vulgare* Linnaeus (Lamiaceae) *Sporothrix schenckii* and *Sporothrix brasiliensis*. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 7, p. 1207-1212, 2015.
- FILGUEIRA, K. D., Esporotricose na espécie canina: relato de um caso na cidade de Mossoró, RN. **Ciência Animal Brasileira**, v. 10, n. 2, p. 673-677, 2009.

- HEIDRICH, D., STOPIGLIA, C. D. O., SENTER, L., VETORATTO, G., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. Sucesso Terapêutico da terbinafina em um caso de esporotricose. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, n. S1, p. 182-185, 2011.
- 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. 54-59, 2007.
- MADRID, I. M., XAVIER, M. O., MATTEI, A. S., CARAPETO, L. P., ANTUNES, T. A., SANTOS JUNIOR, R., NOBRE, M. O., MEIRELES, M. C. A. Esporotricose óssea e cutânea em canino. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, São Paulo, v. 44, n. 6, p. 441-443, 2007a.
- MADRID, I. M., SANTOS JÚNIOR, R., SAMPAIO Jr, 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, n. 1, p. 105-108, 2007b.
- MARQUES, J. L., VOLCÃO, L. M., FUNCK, G. D., KRONING, I. S., SILVA, W. P., FIORENTIN, A. M., RIBEIRO, G. A. Antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. against *Staphylococcus aureus* isolated from poultry meat. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 444-450, 2015.
- MEINERZ, A. R. M.; NASCENTE, P. S.; SCHUCH, L. F. D.; FARIA, R. O.; ANTUNES, T. A.; CLEFF, M. B.; SOUZA, L. L.; XAVIER, M. O.; MADRID, I. M.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Felino doméstico como transmissor da esporotricose em trabalhador rural – relato de caso. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 47, n. 2, p. 149-151, 2007.
- MONTENEGRO, H., RODRIGUES, A. M., DIAS, M. A. G., SILVA, E. A., BERNARDI, F., CAMARGO, Z. P. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. **BMC Veterinary Research**, v. 269, p. 1-10, 2014.
- REIS, E. G.; SCHUBACH, T. M.; PEREIRA, S. A.; SILVA, J. N.; CARVALHO, B. W.; QUINTANA, M. S. B.; GREMIÃO, I. D. F. Association of itraconazole and potassium iodide in the treatment of feline sporotrichosis: a prospective study. **Medical Mycology**, v. 0, n. 0, p. 1-7, 2016.
- STOPIGLIA, C. D. O., MAGAGNIN, C. M., CASTRILLÓN, M. R., MENDES, S. D. C., HEIDRICH, D., VALENTE, P., SCROFERNEKER, M. L. Antifungal Susceptibilities and Identification of species of the *Sporothrix schenckii* complex isolated in Brasil. **Medical Mycology**, v. 52, p. 56-64, 2014.
- WALLER, S. B., MADRID, I. M., FERRAZ, V., PICOLI, T., CLEFF, M. B., FARIA, R. O., MEIRELES, M. C. A., MELLO, J. R. B. Cytotoxicity and anti-*Sporothrix brasiliensis* activity of the *Origanum majorana* Linn. Oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 47, p. 896-901, 2016.
- WALLER, S. B.; MADRID, I. M.; HOFFMANN, J. F.; PICOLI, T.; CLEFF, M. B.; CHAVES, F. C.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A.; MELLO, J. R. B. Chemical composition and cytotoxicity of extracts of marjoram and rosemary and their activity against *Sporothrix brasiliensis*. *Journal of Medical Microbiology*, v. 66, p. 1076-1083, 2017.