

## SENSIBILIDADE *IN VITRO* DE *Sporothrix* spp. FRENTE EXTRATOS DE *Olea europaea* L.

VITTÓRIA BASSI DAS NEVES<sup>1</sup>; MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL<sup>2</sup>; STEFANIE BRESSAN WALLER<sup>3</sup>; LUIZA DA GAMA OSÓRIO<sup>4</sup>; JOÃO ROBERTO BRAGA DE MELLO<sup>5</sup>; MÁRIO CARLOS AUAÚJO MEIRELES<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – vick.bassi@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul – marciaripoll@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas – waller.stefanie@yahoo.com.br

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas – luizaosorio@yahoo.com

<sup>5</sup>Universidade Federal do Rio Grande do Sul – jmello@gabinete.ufrgs.br

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas – meireles@ufpel.edu.br

### 1. INTRODUÇÃO

A Oliveira (*Olea europaea* L.) é uma planta cultivada há mais de seis mil anos (HASHMI et al., 2015) e é reconhecida pelas suas propriedades medicinais. Ela apresenta na sua composição vitamina E, ácidos graxos, compostos fenólicos (como a oleuropeína e o hidroxitirosol) (NUNES et al., 2018), e outros elementos químicos, que são responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (ZORIC et al., 2013; GOEL et al., 2016), antiinflamatória (EIDI et al., 2012; KIM et al., 2018), anticarcinogênica (IMRAN, 2018), antinociceptiva (EIDI et al., 2012), antioxidante (AREE et al., 2018) e citoprotetora (ALY et al., 2018).

Seus extratos são reconhecidos por apresentarem boa atividade antifúngica frente a agentes patogênicos, e por auxiliarem na recuperação de tecidos lesionados (BATTINELLIA et al., 2006; ZORIC et al., 2013). Porém, ainda não foram observados estudos avaliando a atividade *in vitro* de compostos obtidos a partir da oliveira sobre os agentes do Complexo *Sporothrix schenckii*.

A esporotricose, zoonose endêmica no Brasil, apresenta alta prevalência em humanos e felinos, caracterizando-se como um problema de saúde pública no país (POESTER et al., 2018). Além do elevado número de casos desta micose, verifica-se frequentemente a ocorrência de resistência ao fármaco de eleição para o seu tratamento (o itraconazol) resultando em falha terapêutica e recidiva das lesões (STOPIGLIA et al., 2014; WALLER et al., 2017).

Esse quadro incentiva a busca por terapias alternativas que possam fornecer novas moléculas, que sejam mais eficazes no combate a agentes patogênicos (ZORIC et al., 2013; WALLER et al., 2017). Tendo isso em vista, o objetivo deste trabalho foi avaliar a sensibilidade *in vitro* de oito isolados de *Sporothrix* spp. frente extratos de *Olea europaea* L.

### 2. METODOLOGIA

Para a realização deste trabalho foram utilizados três diferentes tipos de extratos de *O. europaea*, o azeite bruto sem processo de filtragem, a infusão do bagaço a dez minutos (IF 10') e a decocção do bagaço a dez minutos (DEC 10'), cedidos pela Estação Experimental Cascata (EEC – EMBRAPA). Para o azeite bruto, foram utilizadas cinco diferentes variedades de *O. europaea*, sendo elas *Koroneiki*, *Picual*, *Coratina*, *Frantoio* e um *blending* de *Arbequina* e *Arbosana*, e para IF 10' e DEC 10' foram utilizadas sete diferentes variedades de *O. europaea*, sendo elas todas as citadas anteriormente mais a variedade *Manzanilla*.

Para a realização dos testes de suscetibilidade antifúngica *in vitro*, foram utilizados oito isolados clínicos de *Sporothrix* spp. que estavam armazenados na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária da UFPel (MicVet), oriundos de dois cães e seis gatos com esporotricose.

Utilizou-se a 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. Uma alíquota dos inóculos foi diluída em meio RPMI-1640, tamponado com glicose a 2% e MOPS. Posteriormente, em microplacas, colocou-se na coluna de letra A o controle negativo, e na coluna de letra H o controle positivo, no intuito de evidenciar a esterilidade do meio de cultura e também dos extratos testados. Foram adicionados, nos poços restantes, 100 µl do inóculo diluído em meio RPMI-1640 e 100 µl do produto a ser testado. As microplacas foram incubadas à temperatura de 25°C por 72h horas até a realização da leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual indica a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico, e que é observada visualmente.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na leitura das placas, foi possível observar que os diferentes extratos testados não inibiram o crescimento de nenhum dos isolados de *Sporothrix* spp. Esse resultado vai de encontro ao que foi visto por Zoric et al. (2013), que verificaram boa atividade antifúngica de substâncias extraídas da oliveira (hidroxitirosol) frente *Candida albicans*.

Ainda, o estudo realizado por Zoric et al. (2013) corrobora com um estudo realizado por Battinellia et al. (2006), que testaram a ação de aldeídos alifáticos, extraídos da azeitona, sobre isolados de *Candida* spp., *Tricophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, verificando boa ação antifúngica frente os dermatófitos testados; porém, não observando boa atividade diante dos isolados de *Candida* spp., assim como foi verificado com os isolados de *Sporothrix* spp. no presente estudo.

Outro estudo avaliou a eficácia de extratos, obtidos a partir de folhas de oliveira frente *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumonia*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, observando boa atividade antimicrobiana frente todos os isolados testados, de forma que os extratos inibiram o crescimento microbiano na menor concentração testada (SAHIN et al. 2017).

Um estudo que avaliou a capacidade de extratos de oliveira realizarem proteção celular contra o estresse oxidativo, verificou grande variação na eficácia dos produtos testados, de acordo com a constituição e com as concentrações dos compostos presentes em cada um. Isso indica que a eficácia de cada extrato poderá variar, de acordo com o tipo de extrato utilizado, e com seus compostos majoritários (PRESTI et al., 2017). Assim, acredita-se que os extratos de *O. europaea* testados não apresentaram boa atividade antifúngica, pois são produtos já processados, com menores teores de compostos bioativos devido a diversos processamentos realizados no produto inicial (GOLDSMITH, 2014; NUNES et al., 2018).

#### 4. CONCLUSÕES

Considerando que a esporotricose é uma doença endêmica no Brasil, e que a resistência aos fármacos usuais torna fundamental a busca por opções terapêuticas para esta micose, verificou-se, no presente estudo, que os extratos de oliveira testados não constituem opções viáveis para a realização do tratamento desta enfermidade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALY, F. M.; OTHMAN, A.; HARIDY, M. A. M. Protective Effects of Fullerene C60 Nanoparticles and Virgin Olive Oil against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1 – 12, 2018.
- AREE, T.; JONGRUNGRUANGCHOK, S. Structure–antioxidant activity relationship of  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complexes with olive tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein: Deep insights from X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 661 – 669, 2018.
- BATTINELLIA, L.; DANIELEA, C.; CRIASTIANIB, M.; BISIGNANOB, G.; SAIJAB, A.; MAZZANTIA, G. In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. fruit. **Phytomedicine**, v. 13, p. 558 – 563, 2006.
- 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.
- EIDI, A.; MOGHADAM-KIA, S.; MOGHADAM, J. Z.; EIDI, M.; REZAZADEH, S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of olive oil (*Olea europaea* L.) in mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 332 – 337, 2012.
- GOEL, N.; ROHILLA, H.; SINGH, G.; PUNIA, P. Antifungal Activity of Cinnamon Oil and Olive Oil against *Candida* spp. Isolated from Blood Stream Infections. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 10, n. 8, p. DC09 – DC11, 2016.
- GOLDSMITH, C. D.; STATHOPOULOS, C. E.; GOLDING, J. B.; ROACH, P. D. Fate of the phenolic compounds during olive oil production with the traditional press method. **International Food Research Journal**, v. 21, n. 1, p. 101-109, 2014.
- HASHMI, M. A.; KHAN, A.; HANIF, M.; FAROOQ, U.; PERVEEN, S. Tradicional uses, phytochemistry, and pharmacology of *Olea europaea* (Olive). **Journal Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2015, p. 1-29, 2015.
- IMRAN, M.; NADEEM, M.; GILANI, N. S.; KHAN, S.; SAJID, M. W.; AMIR, R.M. Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates. **Journal of Food Science**, v. 0, Iss.0, 2018.
- KIM, Y.; CHOI, Y.; KANG, M.; LEE, E.; KIM, D. Y.; OH, H.; KANG, Y. Oleuropein curtails pulmonary inflammation and tissue destruction in models of experimental asthma and emphysema. **J. Agric. Food Chem.** v. June 27, 2018.
- NUNES, M. A.; COSTA, A. S. G.; BESSADA, S.; SANTOS, J.; PUGA, H.; ALVES, R. V.; FREITAS, V.; OLIVEIRAS, M. B. P. P. Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid- and water-soluble components. **Science of the Total Environment**, v. 644, p. 229 – 236, 2018.
- POESTER, V. R.; MATTEI, A. S.; MADRID, I. M.; PEREIRA, J. T. B.; KLAFKE, G. B.; SANCHOTENE, K. O.; BRANDOLT, T. M.; XAVIER, M. O. Sporotrichosis in

Southern Brazil, towards an epidemic? **Zoonoses and Public Health**.v. Jul 15, p. 1-7, 2018.

PRESTI, G.; GUARRASI, V.; GULOTTA, E.; PROVENZANO, F.; PROVENZANO, A.; GIULIANO, S.; MONFREDA, M.; MANGIONE, M. R.; PASSANTINO, R.; SAN BIAGIO, P. L.; COSTA, M. A.; GIACOMAZZA, D. Bioactive compounds from extra virgin olive oils: Correlation between phenolic content and oxidative stress cell protection. **Biophysical Chemistry**, v. 230, p. 109 – 116, 2017.

SAHIN, S.; SAMLI, R.; TAN, A. S. B.; BARBA, F. J.; CHEMAT, F.; CRAVOTTO, G.; LORENZO, J. M. Solvent-Free Microwave-Assisted Extraction of Polyphenols from Olive Tree Leaves: Antioxidant and Antimicrobial Properties. **Molecules**, v. 22, n. 2056, 2017.

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.; PETER, C. M.; HOFFMANN, J. F.; PICOLI, T.; OSÓRIO, L. G.; CHAVES, F.; ZANI, J. L.; FARIA, R. O.; MELLO, J. R. B.; MEIRELES, M. C. A. Chemical and cytotoxic analyses of brown Brazilian propolis (*Apis mellifera*) and its *in vitro* activity against itraconazole-resistant *Sporothrix brasiliensis*. **Microbial Pathogenesis**, 2017.

ZORIC, N.; HORVAT, I.; KOPIAR, N.; VUCEMILOVIC, A.; KREMER, D.; TOMIC, S.; KOSALEC, I. Hydroxytyrosol expresses antifungal activity *in vitro*. **Curr Drug Targets**, v. 14, n. 9, p. 992 – 998, 2013.