

XVIII

CIC

XI ENPOS
I MOSTRA CIENTÍFICA



Evoluir sem extinguir:
por uma ciência do dever



AVALIAÇÃO PRELIMINAR DO USO DE ÓLEO ESSENCIAL DE ALECRIM EM DERMATÓFITOS ISOLADOS DE ANIMAIS

FONSECA, Anelise O. da Silva¹; WENDISCH, Iara³; MATTEI, Antonela Souza¹; SANTIN, Rosema⁵; OSÓRIO Luiza Gama¹; PEREIRA, Daniela Brauer⁸; ALVES, Gabriela Hörmke⁶; RODRIGUES, Maria Regina⁴; MEIRELES, Mário Carlos Araújo²; CLEFF, Marlete Brum⁷

¹Programa de Pós-graduação em Veterinária, Fac. Veterinária, UFPel ²Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, UFPel; ³Bolsista CNPq, Faculdade Veterinária, UFPel; ⁴Departamento de Química Orgânica, UFPel. ⁵Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinária, Fac. Veterinária, UFRGS, ⁶Iniciação científica-Departamento Química Orgânica, UFPel, ⁷Departamento de Clínicas Veterinária, UFPel, ⁸Departamento de microbiologia, UFPEL.

1. INTRODUÇÃO

O crescente aumento das infecções fúngicas nas últimas décadas tem estimulado a pesquisadores a investirem no estudo de opções terapêuticas para o tratamento das micoses de maior ocorrência no nosso meio. Entre estas micoses, destacam-se as dermatofitoses, que são enfermidades que acometem grande número de animais e parte da população. Os causadores dessas doenças são os fungos dermatófitos que pertencem a 3 gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, sendo agentes causadores de processos que afetam pele, pêlos, unhas, entre outros.

As dermatofitoses são tratadas por meio da correção de fatores predisponentes e de terapêutica medicamentosa, sendo crescente a pesquisa utilizando espécies vegetais com potencial medicamentoso.

Rosmarinus officinalis L. é uma planta aromática pertencente à família botânica *Lamiaceae*, sendo largamente distribuído no sul do Brasil onde é muito utilizado como condimento, anti-séptico, etc. O aroma desta planta se deve ao fato desta produzir óleo essencial, que é uma mistura complexa de compostos produzidos pelo seu metabolismo secundário.

Considerando a importância econômica e social do tratamento e controle das dermatofitoses, este estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *R. officinalis* (Alecrim) em espécies de dermatófitos isolados de animais domésticos.

2. MATERIAL E MÉTODOS

As partes aéreas do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram colhidas no mês de fevereiro de 2006, na cidade de Pelotas-RS-Brasil. Após a identificação botânica, a exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Pelotas – UFPel, e registrado sob n^o PEL 24.600.

A secagem e extração do óleo essencial de alecrim foram realizadas no Depto. Química Orgânica – Instituto de Química – UFPel. Para a obtenção do óleo essencial foi utilizado 100g do material vegetal seco, submetido à extração por hidrodestilação, em aparelho tipo Clevenger, durante 4 horas e armazenado em frasco âmbar sob refrigeração até a utilização (Farmacopéia Brasileira IV, 1998; Rodrigues et al., 2004).

A análise cromatográfica do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa e por cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa, em equipamento GC/FID (Schimadzu-17 A) e CG/EM (Schimadzu-5050 A), respectivamente. Os constituintes foram identificados por comparação entre o tempo de retenção dos padrões e das amostras (Rodrigues et al, 2004).

Para avaliar a suscetibilidade fúngica ao óleo essencial foi utilizado o método de microdiluição em caldo, conforme os documentos NCCLS/M-38 (CLSI).

Para realização do estudo foram utilizados quatro isolados de dermatófitos provenientes de animais, sendo um *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e um isolado padrão cedido pela Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz/Rio de Janeiro/Brazil) que foi *Microsporum gypseum* (ATCC 14683).

O inóculo de dermatófitos foi preparado a partir de uma suspensão de culturas jovens e puras dos fungos, as quais foram adicionadas 1ml de salina estéril com 1% de Tween 20, e em seguida os conídios e hifas foram coletados da superfície da colônia e transferidos para um tubo de ensaio estéril. Após cinco minutos, o sobrenadante foi transferido para outro tubo de ensaio, homogeneizado e ajustados para 5×10^4 UFC/ml, após foi diluído a 1:50 em RPMI 1640.

Para a avaliação da atividade, o óleo foi submetido a uma série de nove diluições em logaritmo de base 2, no meio RPMI 1640, obtendo-se óleo em concentrações de 2,0 até 0,004%.

As microplacas foram incubadas a 25°C por 72 h e a susceptibilidade foi expressa pela concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento dos dermatófitos em relação ao controle positivo. Para determinação da CFM, foi retirada uma alíquota de 10 µL de cada poço da placa de microdiluição, feito subcultura em placas contendo ágar Sabouraud e incubado por 72 h para observação do crescimento fúngico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na análise cromatográfica via GC/FID do óleo essencial do *R. officinalis* foi evidenciada a presença de vinte e cinco compostos e via GC/MS foram dezenove, sendo os principais constituintes: cânfora (~51,52 e 56,04%), verbenona (~11,84 e 7,76%), 1,8-cineol (~8,94 e 16,02%), mirceno (~4,50 e 5,06%), alfa-terpineol (~4,39 e 3,74%) e borneol (~2,68 e 2,03%). Outros autores demonstraram a presença de verbenona e borneol, constituindo aproximadamente 80% do óleo essencial (Santoyo et al., 2005), enquanto que Angioni e colaboradores (2004), citaram o alfa-pineno, borneol, canfeno, cânfora e verbenona como principais constituintes do óleo de alecrim. A propriedade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim foi atribuída à presença de α -pineno, 1,8-cineol, canfeno, limoneno, cânfora, verbenona, e

borneol, com o borneol sendo o mais eficaz, seguido pela cânfora e pela verbenona (Giordani et al., 2004).

Após o período de incubação, as placas de microdiluição foram observadas, demonstrando diferenças de suscetibilidade ao óleo essencial do *R. Officinalis* entre as espécies de dermatófitos. O isolado de *M. gypseum*, obtido do tegumento cutâneo de cão, apresentou-se sensível nas concentrações médias de 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial tanto para a CIM como para CFM, apresentando ação fungicida e fungistática nesta concentração, enquanto que o isolado padrão apresentou CIM igual a 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e CFM de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A amostra de *M. canis* foi aquela que apresentou maior sensibilidade com concentrações de 2,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ tanto para CIM como para CFM. A amostra de *T. verrucosum* apresentou CIM $\geq 10 \mu\text{L mL}^{-1}$, demonstrando resistência nas concentrações testadas, sendo necessário avaliar outras concentrações do óleo e outros isolados, a fim de confirmar este resultado (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de CIM e CFM do óleo essencial do alecrim em isolados de dermatófitos obtidos de animais com lesões e isolado padrão

ISOLADOS	*CIM (%)	*CIM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	**CFM (%)	**CFM ($\mu\text{L mL}^{-1}$)
1. <i>M. gypseum</i>	0,5 - 1	5	0,5 - 1	5
2. <i>M. gypseum</i> ^a	0,25 - 1	2,5	1	10
3. <i>T. verrucosum</i>	>1	> 1	> 1	> 10
4. <i>M. canis</i>	0,25 - 1	2,5	0,25 - 1	2,5

*CIM = concentração inibitória mínima; **CFM = Concentração fungicida mínima

^a Isolado padrão ATCC 14683

Celiktas e colaboradores (2007) ao estudarem a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *R. officinalis* em isolados de bactérias e *Candida albicans*, observaram que a atividade do óleo estava na dependência da localização e variação sazonal. Outros estudos demonstram a potencialidade antimicrobiana do alecrim, usando técnicas adaptadas de antifungigrama como, difusão em ágar, difusão em disco e diluição em caldo (Lambert et al., 2001; Angioni et al., 2004; Santoyo et al., 2005; Schwiertz et al., 2006; Gachkar et al., 2007).

Apesar do reconhecimento das propriedades antimicrobianas, o mecanismo de ação dos extratos e/ou óleos essenciais ainda não está completamente elucidado, porém estudos têm sido conduzidos neste sentido (Sikkema et al., 1995; Sartoratto et al., 2004).

Os testes da susceptibilidade em isolados fúngicos têm grande importância clínica para a escolha da terapêutica adequada, sendo relevantes quando considerado a resistência microbiana e as características particulares de cada paciente. A importância destas observações foi evidenciada pela inibição do crescimento dos dermatófitos pelo óleo de alecrim, sendo que estes fungos apresentam grande importância por serem agentes de infecções superficiais em animais e humanos, caracterizando-a como zoonose.

4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares demonstraram que o óleo essencial de alecrim colhido na cidade de Pelotas – RS – Brasil, apresentou atividade fungicida e fungistática *in vitro* em dermatófitos isolados de animais, as perspectivas são de novas análises com maior número de isolados.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGIONI, A. et al. Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3530-3535, 2004.
- CELIK TAS, O.Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, n.100, p.553-559, 2007.
- Farmacopéia Brasileira**. Parte I, 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988. Paginação irregular.
- GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, n.102, p.898-904, 2007.
- GIORDANI, R. et al. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Reserch**, n.18, p.990-995, 2004.
- LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied of Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard M27-A2. Wayne, PA, USA: NCCLS, 2002.
- RODRIGUES, M.R.A. et al. Chemical composition and extraction yield of the extract of *Origanum vulgare* obtained from sub- and supercritical CO₂. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n.52, p.3042-3047, 2004.
- SANTOYO, S. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, n.68, p.790-795, 2005.
- SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, n.4, p.275-280, 2004.
- SCHWIERTZ, A. et al. *In vitro* activity of essential oils on microorganisms isolated from vaginal infections. **International Journal of Aromatherapy**, v.16, p.169–174, 2006.
- SIKKEMA, J.; BONT, J.A.M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v.59, p.201-222, 1995.