

AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ROSMARINUS OFFICINALIS* (ALECRIM) FRENTE À ZOOSPOROS DE *PYTHIUM INSIDIOSUM*

STORINO, Laura Garcia¹; FONSECA, Anelise Oliveira da Silva²; PEREIRA, Daniela Isabel Brayer³; CORRÊIA, Bruna⁴

¹ Graduanda em Medicina Veterinária – UFPel, Bolsista AT/CNPq storinoangie@hotmail.com

² Programa de Pós-Graduação em Veterinária – UFPel

³ Profº Adjunto – Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Instituto de Biologia – UFPel

⁴ Graduanda em Biologia – Instituto de biologia – UFPel

MEIRELES, Mário Carlos Araújo⁵

⁵ Profº Associado – Departamento Veterinária Preventiva – Faculdade de Veterinária - UFPel

1 INTRODUÇÃO

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, conhecido popularmente por alecrim, tem sido foco de muitos estudos em termos de sua composição química e das suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Por ser uma planta aromática, contém óleo essencial em quantidade relativamente expressiva (SAITO & SCRAMIN, 2000), sendo que este óleo se encontra na epiderme das folhas e dos ramos onde estão localizados os pêlos secretores (CRAVEIRO et al., 1981).

Pythium insidiosum é patogênico de mamíferos, sendo o agente causador da pitiose, uma doença crônica, piogranulomatosa, que atinge eqüinos, caninos, bovinos, felinos e humanos, ocorrendo em áreas tropicais, subtropicais ou temperadas (MEIRELES et al., 1993; MENDOZA et al., 1996). A espécie eqüina é a mais atingida principalmente nas formas cutânea e subcutânea (MENDOZA et al., 1996). A produção de zoósporos móveis biflagelados por este microrganismo, que são estruturas responsáveis pela reprodução assexuada, se constitui no fator determinante da ocorrência da enfermidade dependendo de temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água em banhados e lagoas (MILLER & CAMPBELL, 1982a). A pitiose apresenta grande dificuldade de tratamento devido à escassez de drogas antifúngicas ativas contra o agente (SATHAPATAYAVONGS et al., 1989; FOIL, 1996). O objetivo deste estudo foi avaliar a suscetibilidade, *in vitro*, de zoósporos de *Pythium insidiosum* frente ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*.

2 MATERIAIS E METODOS

As partes aéreas do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram colhidas no mês de fevereiro de 2008, na cidade de Pelotas-RS-Brasil. Após a identificação botânica, a exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Pelotas – UFPel.

A secagem e a extração do óleo essencial de alecrim foram realizadas no Depto. Química Orgânica – Instituto de Química e Geociência - 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 M-38 (CLSI, 2008).

Para realização do estudo foram utilizados quatro isolados de *Pythium insidiosum* provenientes de eqüinos doentes. Estes foram repicados para placas de Petri contendo Agar levedura, juntamente com fragmentos de grama (*Paspalum notatum*), previamente autoclavadas a 121°C por 20 minutos. As placas foram incubadas por um período de cinco dias à temperatura de 37°C. Após esse período de cultivo, os fragmentos de grama parasitados pelo fungo foram transferidos para uma placa de Petri contendo 30mL de Meio de Indução, composto pela solução A: K₂HPO₄ (1,0 M), KH₂PO₄ (1,0 M), (NH₄)₂HPO₄ (3,66 M), e pela solução B: MgCl₂.6H₂O (0,5 M), CaCl₂.2H₂O (0,5 M). O Meio de Indução foi obtido pela mistura de 0,5mL da solução A e 0,1mL da solução B em 1.000mL de água destilada estéril. As placas de Petri contendo o Meio de Indução juntamente com a grama infectada foram incubadas a 37°C, por 24 horas. Durante esse período, os fragmentos de grama foram regularmente observados, através de microscopia óptica (100 e 400 X) entre lâmina e lamínula. Após observação da formação de zoosporângios e liberação dos zoósporos, realizou-se a contagem de zoósporos livres no Meio de Indução, utilizando-se hemocitômetro de Neubauer (PEREIRA et al., 2008).

O inóculo foi preparado a partir de 1ml do meio de indução com zoósporos livres, no qual foi adicionado 9ml de 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 1,5 até 0,0037%.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 48h e a susceptibilidade foi expressa pela concentração inibitória mínima (CIM). A CIM foi definida como a menor concentração capaz de produzir inibição do crescimento do *Pythium insidiosum* em relação ao controle positivo.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Após o período de incubação, as placas de microdiluição foram observadas, demonstrando diferenças de suscetibilidade ao óleo essencial do *Rosmarinus officinalis* entre os isolados de *Pythium insidiosum* (Tabela 1).

Tabela 1: Valores de CIM do óleo essencial do alecrim em isolados de *Pythium insidiosum* obtidos de animais com lesões.

ISOLADOS	*CIM (%)	*CIM (µLmL ⁻¹)
002	0,0037 – 0,037	0,37
004	0,0037 – 0,075	0,75
008	0,0037 – 0,075	0,75
010	0,0037 – 0,037	0,37

*CIM = concentração inibitória mínima

Os testes da susceptibilidade em isolados fúngicos têm grande importância clínica para a escolha da terapêutica adequada.

Celiktas e colaboradores (2007) ao estudarem a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* em isolados de bactérias e leveduras,

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 (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).

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos demonstraram que o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* colhido na cidade de Pelotas – RS – Brasil, apresentou atividade fungistática, *in vitro*, frente a zoósporos de *Pythium insidiosum*.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS.

5 REFERÊNCIAS

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.

CRAVEIRO, A. A.; et al. **Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste**; UFC: Fortaleza, 1981, p. 63, 202 – 209.

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.

FOIL, C.S. Update on pythiosis (Oomycosis). In: **THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE**, 1996, Orlando. Proceedings... Orlando: Bayer Animal Health, 1996. p.57-63.

MEIRELES, M.C.A., RIET-CORREA, F., FISCHMAN, O., et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**, v.36, p.139-142, 1993.

MENDOZA, L., AJELLO, L., MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal Mycology Medical**, v.6, n.4, p.151-164, 1996.

MILLER, R.I., CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v.58, p.221-226, 1982a.

PEREIRA, D.I.B. et al. Zoosporogênese in vitro entre isolados do oomiceto *Pythium insidiosum*; **Ciência Rural, Santa Maria**; V.38, n°1, pg. 143-147, 2008.

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.

SAITO, M. L.; SCRAMIN, S. **Plantas Aromáticas e Seu Uso na Agricultura**; Jaguariúma: Embrapa Meio Ambiente, 2000, p. 7, 8, 13, 21, 23, 24, 33-36.

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.

SATHAPATAYAVONGS, B., LEELACHAIKUL, P., PRACHAKTAM, R., et al. Human pythiosis associated with Thalassemia Hemoglobinopathy Syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v.159, n.2, p.274-280, 1989.

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.