

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE *Olea europaea* FRENTE A FUNGOS
LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS**

Márcia Kutscher Ripoll

Porto Alegre

2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE *Olea europaea* FRENTE A FUNGOS
LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS**

Autor: Márcia Kutscher Ripoll

**Dissertação apresentada como
requisito parcial para obtenção do
grau de Mestre em Ciências
Veterinárias na área de
Toxicologia, Farmacologia e
Terapêutica Animal.**

Orientador: João Roberto Braga de
Mello

Coorientadora: Renata Osório de
Faria

PORTO ALEGRE

2019

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001 .
This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001.

CIP - Catalogação na Publicação

Ripoll, Márcia Kutscher
POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE *Olea europaea* FRENTE A
FUNGOS LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS / Márcia Kutscher
Ripoll. -- 2019.
56 f.
Orientador: João Roberto Braga de Mello.

Coorientadora: Renata Osório de Faria.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2019.

1. Fungos. 2. Teste de Microdiluição. 3. *Candida* sp. 4. *Sporothrix* sp. 5. *Microsporum* sp. I. Mello, João Roberto Braga de, orient. II. Faria, Renata Osório de, coorient. III. Título.

Márcia Kutscher Ripoll

POTENCIAL ANTIFUNGICO DE *Olea europaea* FRENTE A FUNGOS
LEVEDURIFORMES E FILAMENTOSOS

Aprovada em 15 FEV 2019

APROVADO POR:

Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Mário Carlos Araujo Meireles
Membro da Comissão

Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

Prof. Dr. Régis Adriel Zanette
Membro da Comissão

RESUMO

A Oliveira (*Olea europaea* L.) é a única espécie da família das *Oleaceae* que produz fruto comestível, é considerado um dos plantios mais antigos, com sua origem relatada primordialmente na Palestina. Estudos recentes revelam que o azeite e seus compostos têm comprovada eficácia na medicina para tratamentos de doenças crônicas, sendo eficaz também em enfermidades cardiovasculares, diabetes, possuindo ação anticancerígena, anti-inflamatória, anticarcinogênica, antinociceptiva, antioxidante e citoprotetora, e tanto no azeite quanto em extratos de folhas e ramos da planta, sua ação frente a micro-organismos já foi comprovada através de estudos *in vitro*. Estudos têm revelado cepas resistentes a antifúngicos tradicionalmente utilizados na clínica, nessa perspectiva e com propósito de avaliar a atuação dos extratos provenientes da oliveira frente a fungos patogênicos e/ou oportunistas, delineou-se esta proposta com a intenção de obter-se um extrato fungicida e/ou fungistático, testando a citotoxicidade dos extratos em *bovine kidney cells* (MDBK) e também a presença de compostos fenólicos através da CLAE. Na possibilidade de novas alternativas e na tentativa da obtenção de produtos efetivos, foram obtidos extratos aquosos do bagaço para utilização em teste de sensibilidade *in vitro* a partir da microdiluição em caldo conforme proposto pelo CLSI de acordo com os documentos M27-A3 e M38-A2, frente a fungos do gênero *Candida* spp., Complexo *Sporothrix schenckii* e dermatófitos. Segundo a metodologia desenvolvida obteve-se os seguintes resultados, a INF 10' não foi efetiva para nenhum dos isolados e cepas padrões testados, assim como as variedades arbequina, arbosana, frontoio e manzanilla não revelaram presença de oleuropeína e obtiveram baixas concentrações de hidroxitirosol na sua composição. Os extratos de DEC 10' foram efetivos para duas cepas padrões de *Candida albicans*, inibindo a partir de concentrações de 3,12 mg/mL, porém não apresentou inibição em isolados clínicos de *Candida* spp., dermatófitos e *Sporothrix* spp. Os extratos apresentaram taxas de 15 a 50% de viabilidade celular a partir do teste de toxicidade dos extratos de concentração de 25 mg/mL, que torna o extratos viável por não apresentar intensa toxicidade. Nas condições trabalhadas, permite-se concluir que os extratos não apresentaram os resultados esperados como antimicrobiano, não apresentaram citotoxicidade e algumas variedades revelaram presença de oleuropeína.

Palavras-chave: Extratos aquosos, oliveira, dermatófitos, *Sporothrix* spp., *Candida* spp.

ABSTRACT

Oliveira (*Olea europaea* L.) is the only species of the *Oleaceae* family that produces edible fruit, is considered one of the oldest tree, with origin reported primarily in Palestine. Recent studies have shown that olive oil and its compounds have effect in the treatment of chronic diseases. It's also effective in cardiovascular diseases, diabetes, anticancer, anti-inflammatory, anticarcinogenic, antinociceptive, antioxidant and cytoprotective actions, and in extracts of leaves and part of the plant, their action against microorganisms has already been proven through in vitro studies. Studies revealed antifungal resistant against clinical strains, with the purpose of evaluating the performance of extracts from the olive tree against pathogenic and/or opportunistic fungi, this proposal was outlined with the intention of obtaining a fungicide extract and/or fungistatic, testing the cytotoxicity of extracts in bovine kidney cells (MDBK) and also the presence of phenolic compounds through HPLC. With the possibility of new alternatives and in the attempt to obtain effective products, aqueous extracts of the bagasse were obtained for use in an in vitro sensitivity test from the microdilution in broth as proposed by CLSI according to documents M27-A3 and M38-A2 , against fungi of the genus *Candida* spp., *Sporothrix schenckii* Complex and dermatophytes. According to the methodology developed, the following results were obtained: INF 10' was not effective for any of the isolates and strains tested, as the arbequina, arbosana, frontoio and manzanilla varieties didn't show presence of oleuropein and obtained low concentrations of hydroxytyrosol their composition. The DEC 10' extracts were effective for two standard strains of *Candida albicans*, inhibiting from concentrations of 3.12 mg/mL, but did not present inhibition in clinical isolates of *Candida* spp., Dermatophytes and *Sporothrix* spp. The extracts presented rates of 15 to 50% of cell viability from the toxicity test in extracts of concentration with 25 mg/mL, which makes the extracts viable because it doesn't present intense toxicity. Under the conditions studied, it's possible to conclude that the extracts did not present the expected results as antimicrobial, didn't present cytotoxicity and some varieties showed the presence of oleuropein.

Keywords: Aqueous extracts, olive tree, dermatophytes, *Sporothrix* spp., *Candida* spp.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Concentração Inibitória Mínima (CIM) apresentada no teste *In vitro* do extrato de decocção 10' frente a fungos do gênero *Candida* spp. 28
- Tabela 2** – Concentração Fungicida Mínima (CFM) apresentada no *In vitro* do extrato de decocção 10' frente a fungos do gênero *Candida* spp. 29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Viabilidade celular frente a extratos de Arbosana, Arbequina, Coratina e Frontoio em decocção 10' 30
- Figura 2** – Viabilidade celular frente extratos de Koroneiki, Picual e Manzanilla em decocção 10' 30
- Figura 3** – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de extratos de bagaço decocção 10' 31

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	8
2	OBJETIVOS	10
2.1	Objetivo Geral	10
2.2	Objetivo Específico	10
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	11
3.1	Oliveira (<i>Olea europaea</i> L.)	11
3.2	Antifúngicos na Medicina Veterinária	13
3.3	Dermatofitose	15
3.4	Esporotricose	16
3.5	Candidose	18
4	ARTIGOS CIENTÍFICOS	20
4.1	Artigo I – Delineamento de suscetibilidade <i>in vitro</i> de extratos aquosos de <i>Olea europaea</i> frente a fungos filamentosos e leveduriformes	20
5	CONCLUSÃO	42
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	42
	REFERÊNCIAS	44
	ANEXOS	49
	ANEXO I - Resumo expandido publicado na Terceira Semana Integrada (SIIEPE) da Universidade Federal de Pelotas 2017, categoria XIX Encontro de Pós-Graduação	50

1 INTRODUÇÃO

A Oliveira (*Olea europaea* L.) é a única espécie da família das *Oleaceae* que produz fruto comestível. O seu cultivo data de três a quatro mil anos a.C., sendo considerado um dos plantios mais antigos, com sua origem relatada primordialmente na Palestina. A partir da azeitona que são extraídos os óleos de oliva, também denominados de azeite. O seu plantio é realizado em regiões de clima temperado ou subtropical, caracterizados por verões calorosos e secos, contando com baixas temperaturas para sua floração. (COUTINHO et al., 2015).

Na indústria oleícola, durante cultivo e processamento do azeite têm-se grande produção de resíduos. Esses resíduos podem ser provenientes da poda, onde ocorre o descarte das folhas e também do processamento do azeite, podendo ser classificados em resíduos líquidos e sólidos (bagaço). Estudos realizados em regiões de grandes produções localizadas na Europa indicam que das azeitonas colhidas para produção de azeite, o rendimento é de apenas 20% do total, e 80% são destinados ao descarte (bagaço e resíduo aquoso) (ALCAIDE et al., 2010). Esses subprodutos têm sido utilizados de diversas formas, sendo eles, adubos e pesticidas (CABRERA, et., 2010), ração animal, obtenção de energia (MORE, 2008) e também através dos seus extratos, revelaram atividade antimicrobiana (PEREIRA et al., 2007; MARKIN et al., 2003; ZORIC et al., 2013; GOEL et al., 2016).

De modo geral, há dois tipos de metabólitos produzidos por vegetais, o primário e o secundário. O primeiro corresponde à sobrevivência da planta, e o segundo correspondente à sua defesa, podendo ser separados em três grandes grupos: compostos fenólicos, terpenos e compostos que contém nitrogênio (TAYZ & ZEIGER, 2004). Sabe-se que a oliveira é rica em compostos fenólicos tais como: oleuropeína, tirosol, hidroxitirosol (JUVEN et al., 1970). Historicamente, os extratos de oliveira eram utilizados na medicina no combate a doenças (BENAVENTE-GARCIA et al., 2000). Estudos recentes revelam que o azeite e seus compostos têm comprovada eficácia na medicina para tratamentos de doenças crônicas devido a sua atividade moduladora de radicais livres, sendo eficaz também em enfermidades cardiovasculares, diabetes, possuindo ação anticancerígena (MELLO et al., 2012), anti-inflamatória (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), e tanto no

azeite quanto em extratos de folhas e ramos da planta, e sua ação frente a micro-organismos já foi comprovada através de estudos *in vitro* (PEREIRA et al., 2007; MARKIN et al., 2003; ZORIC et al., 2013; GOEL et al., 2016).

Existem cerca de 800.000 espécies de fungos conhecidos e relatados pela ciência, 400 deles são patogênicos para animais e seres humanos. Esses micro-organismos pertencem ao Reino Fungi e são classificados eucariontes podendo ser pluri ou unicelulares e heterótrofos. Há, principalmente, três tipos morfológicos de fungos, os filamentosos, os leveduriformes, havendo também os fungos termodimórficos, que apresentam as duas morfologias de acordo com a temperatura em que se encontram. Fungos capazes de metabolizar queratina e transformar em nutriente são denominados dermatófitos, pertencentes a categoria de fungos filamentosos patogênicos que podem parasitar homens e animais. Em contato com a pele, desenvolve-se de maneira centrífuga, invadindo o extrato córneo, realizando uma reação inflamatória devido a produção de metabólitos tóxicos. Esse grupo compreende três gêneros que podem ser diferenciados a partir da forma de seus conídios, são eles *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*. (CRUZ, 1985; LARONE, 2011; QUINN et al., 2011; MEIRELES & NASCENTE, 2009). Já os fungos leveduriformes, são micro-organismos unicelulares, eucariotos e de forma redonda a ovalada. Suas colônias possuem textura úmida e cremosa, podendo ser encontradas no ambiente, comensais em mucosas e pele dos animais e em sua maioria podem ser consideradas oportunistas. *Candida* sp., *Malassezia* sp. e *Cryptococcus* sp. são espécies de leveduras causadoras de doenças de importância na medicina e veterinária. E por fim, o *Sporothrix* sp. fungos termodimórficos, agentes da esporotricose, que causam lesões subcutâneas e sistêmicas. A infecção ocorre através de inoculação traumática de conídios, devido a esse fator a doença é classificada como uma micose de implantação e pode acometer homem e animais (LARSSON, 2011; TRABULSI et al., 2008; QUINN et al., 2005).

As terapias antifúngicas consistem no emprego de fármacos como cetoconazol, anfotericina B, itraconazol, iodeto de potássio, terbinafina e equinocandinas. Contudo, estudos revelaram a existência de cepas resistentes a esses fármacos, principalmente devido ao seu uso indiscriminado (NOBRE et al., 2002; ODDS et al., 2003). Nessa perspectiva, tem-se procurado métodos alternativos para auxiliar no tratamento das afecções fúngicas, tendo nas plantas e seus extratos uma fonte próspera para tratamento,

como demonstram estudos realizados, não somente com fungos, mas também com bactérias, mostrando ser eficiente no combate a ambos micro-organismos (SUDJANA et al., 2009; KORUKLUOGLU, et al., 2006; WALLER et al., 2016). Sempre salientando a importância desses fitoterápicos seguirem a mesma segurança, controle de qualidade e eficácia que os medicamentos aloterápicos disponíveis no mercado (KLEIN et al., 2009).

A fim de recorrer a novas alternativas para tratamentos de doenças causadas por fungos, plantas com ação medicinal estão sendo testada devido a sua atual utilização a nível popular, seja em infusões, óleos essenciais e extratos alcoólicos. Sabe-se que os principais compostos que atuam combatendo micro-organismos são os compostos fenólicos, contudo o extrato, em seu conjunto, tem se mostrado mais benéfico que estes compostos isoladamente (PEREIRA et al., 2007). A possibilidade dessas novas alternativas e na tentativa de observar efetividade dos extratos, os quais há escassez de estudos *in vitro*, realizou-se esse projeto com a prerrogativa de obter-se um extrato eficiente frente à fungos patogênicos mais recorrentes na medicina veterinária e após testes *in vitro* e *in vivo*, utilizar os compostos isolados ou em associação a antifúngicos comerciais para combate desses micro-organismos.

2 OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica de diferentes extratos de *Olea europaea*, frente a fungos patogênicos.

2.2. Objetivo Específico

Avaliar as atividades fungistática e fungicida de extratos obtidos de diferentes partes de *Olea europaea*, incluído azeite bruto, azeite comercial e extratos aquosos de bagaço.

Estabelecer a citotoxicidade *in vitro* de *Olea europaea* na forma de extrato aquoso do bagaço em cultura de células.

Analisar através de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) os principais constituintes químicos presentes nos extratos obtidos e utilizados no teste *in vitro*.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1.Oliveira (*Olea europaea* L.)

Olea europaea L., tradicionalmente conhecida como oliveira, é a única a produzir fruto comestível entre as espécies da família *Oleaceae*. Do gênero *Olea*, há em torno de 35 espécies conhecidas. Relatado inicialmente na Palestina, datado de 3 a 4 mil a.C. é considerado um dos mais antigos cultivos. Concentra-se principalmente em latitudes de 30° e 45° em ambos os hemisférios (Norte e Sul), sua plantação é preconizada nas áreas de clima mediterrâneo onde há baixas temperaturas em períodos de floração e verões com altas temperaturas e baixa umidade, apesar de seu cultivo também ser empregado em regiões tropicais (COUTINHO et al., 2015).

No Brasil, o cultivo foi instaurado há muitos séculos e espalhou-se por diversas Federações. Atualmente o interesse pela cultura da oliveira vem expandindo e pode-se destacar São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Rio Grande do Sul como os estados com maior frequência (COUTINHO et al., 2009; COUTINHO et al., 2015). Sexto maior consumidor de azeite no mundo e terceiro maior importador, segundo dados da Internacional Olive Oil Council (2018), o Brasil importou mais de 60 mil toneladas de azeite, aumentando em seis vezes sua importação desde os anos de 1990 (COI, 2009).

Nos anos de 1948, a oliveira foi introduzida no Rio Grande do Sul, sua produção e venda foi estimulada através de criação de órgãos especializados apoiados pelo governo com o intuito de estimular fomento à pesquisa. Os plantios comerciais ativos estão presentes, atualmente, na região de Caçapava do Sul, Dom Pedrito, Encruzilhada, Rio Grande, Santana do Livramento, Cachoeira do Sul, Vacaria e Bagé. São aproximadamente 1,6 mil hectares de oliveiras no estado, onze marcas registradas e seis indústrias de azeite, com isso, destacando sua produção no território brasileiro (COUTINHO et al., 2009; GOMES, 1979).

Cultivada geralmente em solo do Mediterrâneo, local que possui invernos frios e verões com elevadas temperaturas e baixos índices pluviométricos. O cultivar possui limiar de temperatura entre 12,5 a 40°C, porém sua temperatura de conforto em que há frutificação limita-se de 25 a 35°C, por ser mais vulnerável ao frio que outras plantas frutíferas. Necessita baixos índices pluviométricos devido à presença de estômatos no interior das folhas, impedindo a perda de água pela transpiração e permitindo retomada

imediate após situações de estresse. A exigência pluviométrica é em torno de 650 a 800 mm/ano, preferencialmente com chuvas regulares, pois o excesso de umidade é nocivo para a planta facilitando doenças fúngicas e dificultando a polinização (VILLA, 2004; COUTINHO et al., 2009; BARRANCO et al., 2004).

Das condições de maior importância na plantação de um cultivar de oliveira estão: disponibilidade de nutrientes, drenagem do solo, profundidade e estrutura, textura e reação (neutra, ácida ou alcalina). Para correta avaliação, deve-se fazer uma correta amostragem do solo e posterior análise, assim como amostragem das folhas. Os solos do Rio Grande do Sul são conhecidos por sua deficiência nutricional, portanto, após a avaliação de solo pode-se adubar através de nitrogênio, boro, fósforo potássio. No momento do plantio é preconizado no fim do inverno, para evitar que o cultivar passe por períodos de geadas, que podem comprometer o crescimento normal da planta (PARRA et al., 2003; COUTINHO et al., 2009; COUTINHO et al., 2015; BARRANCO et al., 2004).

A poda tem como principal propósito propiciar formato adequado e obter máxima produção em menos tempo. No olival, a poda deve balancear frutificação e crescimento, não provocar envelhecimento precoce e nem desvitalizar a planta, devendo ser de baixo custo. Tem-se principalmente dois tipos de poda, a de frutificação e a de formação. Pode ser realizada anualmente ou uma vez a cada dois anos, preferencialmente no fim do inverno e início da primavera, evitando que ocorra anteriormente a possíveis momentos de geada pois a árvore encontraria-se desprotegida (BARRANCO et al., 2004; PASTOR et al., 1995; COUTINHO et al., 2009).

Recentes pesquisas sugerem o plantio de certos cultivares específicos para o sul do Brasil, de acordo com seu resultado em avaliações agronômicas de solo e clima. Sendo eles a Arbequina, que conta com elevada produtividade e rendimento graxo, produzindo um azeite de suprema qualidade, porém com baixa estabilidade. A Picual é a variedade de maior importância no mundo, considerada uma planta rústica, porém sensível à seca e solos demasiadamente alcalinos. Koroneiki, conta com a produtividade mais constante, sensível ao frio, porém resiste melhor a períodos de seca. Frantoio, de produtividade constante e elevada e alta capacidade de adaptação. Arbosana, muito semelhante a Arbequina, porém sua colheita é realizada após alguns dias da colheita de sua similar. Coratina, possui facilitada adaptação à diversas zonas de cultivo, entra

precocemente em estado de produção e se comporta bem em regiões de frio intenso, porém fortemente sensível a certos parasitas. Manzanilla é a variedade mais disseminada internacionalmente por demonstrar características de alta qualidade e produtividade do fruto, além de também entrar precocemente em fase de produção. A região sul conta com distintos cultivares, dispondo de diferentes pontos favoráveis e desfavoráveis (COUTINHO, 2007; COUTINHO, 2009; AOC, 2018; BARRANCO et al., 2004).

3.2. Antifúngicos na Medicina Veterinária

Antifúngico é conceituado como qualquer substância capaz de realizar alterações na estrutura da célula fúngica, fazendo com que altere sua viabilidade inibindo seu desenvolvimento e capacidade de manter o organismo vivo (VARGAS, et al., 2005). Até a década de oitenta, diversos antissépticos eram utilizados no tratamento de doenças micóticas, como quinonas, antifúngicos poliênicos, ácido salicílico e benzoico, cristal violeta e tintura de iodo (TORTORA et al, 2000). Atualmente o iodo ainda é utilizado, pois é uma alternativa economicamente viável devido ao baixo custo e pode ser administrado através de soluções saturadas via oral (VO) na forma de iodetos em concentração de 20%. Apesar de uma opção economicamente acessível possui diversos efeitos colaterais e frequentemente ocorre reações alérgicas, principalmente em felinos que possuem sensibilidade à compostos com iodo (LACAZ et al., 2002).

Através do isolamento da *Streptomyces noursei* foi sintetizado o primeiro antibiótico poliênico que até hoje é amplamente utilizado em casos clínicos de candidíase vaginal e oral. A nistatina, derivada do isolamento dessa bactéria, é um dos inúmeros antibióticos poligênicos descritos e utilizados para micoses. A anfotericina B também é um antibiótico do mesmo grupo da nistatina, após sua descoberta foi utilizada em casos de doenças fúngicas, porém devido a sua alta toxicidade tornou-se pouco utilizada na clínica. Em casos de otite externa causada por *Malassezia* spp. a nistatina também é usada em associação com antibióticos tópicos (FARIAS & GIUFFRIDA, 2002; JAHAM, 2000).

Devido ao aumento de doenças fúngicas, em meados dos anos oitenta houve o aparecimento de uma nova classe de antifúngicos com estrutura química totalmente

diferente do que já havia no mercado. Conhecido como derivados azólicos, os fármacos presentes nessa classe possuem uma estrutura que apresenta um ou mais anel azólico conectados a ligações do tipo C-N. Sua forma de atuação é em nível de ergosterol, e agem inibindo a síntese desse componente interferindo no citocromo P-450. Após a troca de ergosterol por precursores metilados ocorre a formação de membrana plasmática defeituosa aumentando a permeabilidade e prejudicando a troca e captação de nutrientes para dentro da célula fúngica resultando em morte celular. Além de prejudicar a produção de ergosterol, interfere no sistema enzimático a partir do mecanismo peroxidativo e do oxidativo. Esses fármacos são divididos em dois grupos, os triazóis que engloba os fármacos fluconazol e itraconazol, e os imidazóis que são o miconazol e cetoconazol (FARIAS & GIUFFRIDA, 2002; NOBRE et al., 2002, JAHAM et al., 2002; TORTORA et al., 2000).

O primeiro imidazol utilizado na clínica foi o cetoconazol por VO para terapêutica de micoses sistêmicas, possuindo também boa efetividade frente à dermatófitos. Possui principal metabolização hepática e biliar, não possuindo efetividade no tratamento de micoses como esporotricose e aspergilose devido a sua limitada distribuição, não sendo recomendada para animais lactantes e prenhez. O fluconazol encaixa-se nos fármacos de eleição para tratamento de micoses no sistema nervoso central (SNC), apresentando alta segurança no seu uso e é amplamente empregada em afecções por fungos filamentosos como *Aspergillus* spp e também para leveduras do gênero *Candida* em pacientes que apresentam neutropenia. O itraconazol é amplamente utilizado na clínica de pequenos animais para tratamento de blastomicose, criptococose, aspergilose e dermatofitose, sendo o fármaco de eleição para a esporotricose, devido à baixa toxicidade e alta distribuição tecidual (JAHAM et al., 2002; FARIAS & GIUFFRIDA, 2002; NOBRE et al., 2002).

Em suma, o número de fármacos antifúngicos é escasso para tratamento de micoses em animais, além de relatos de resistência de isolados fúngicos, os efeitos colaterais também restringem o uso desses fármacos (NOBRE et al., 2002; LUGMAN et al., 2007). A partir dessa situação, a importância de alternativas terapêuticas que possam atuar sinergicamente ou individualmente vem ganhando espaço nas pesquisas. Visando principalmente sanar os problemas de resistência aos fármacos, alto custo dos medicamentos e diminuição de efeitos colaterais, o

conhecimento de plantas medicinais como fontes terapêuticas para tratamentos de micoses. Estudadas e testadas em *in vitro* já comprovando a eficácia da utilização de partes de plantas para inibição ou morte de agentes fúngicos (ODDS, 2003; JOHANN et al., 2007; WALLER et al., 2016)

3.3.Dermatofitose

Os dermatófitos são capazes de metabolizar queratina transformando-a em nutrientes para sobrevivência, fazem parte das espécies fúngicas patogênicas/oportunistas que parasitam tanto humanos quanto animais. Classificada como uma escleroproteína, a queratina possui diversas cadeias de polipeptídeos unidas através de ligação covalente e de ligações de hidrogênio a moléculas de enxofre. Ao se instalar causando lesão, os dermatófitos realizam a quebra dessas ligações e expandem seu crescimento em busca de novas fontes de queratina. A dermatofitose é classificada como uma micose superficial e a partir da produção de metabólitos pelo agente, ocorre a reação inflamatória devido a toxicidade dos mesmos. E por não sobreviverem muito tempo em tecidos inflamados ou com infecção bacteriana secundária, alguns dermatófitos extinguiram a produção desses elementos irritantes. São divididos em três gêneros, os *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton*, suas diferenciações se dão a partir da macro e microscopia. Na clínica de pequenos animais, destacam-se as espécies *M. canis*, *M. gypseum* e *T. mentagrophytes*, devido a sua alta ocorrência. É uma micose que atinge principalmente animais jovens, devido ao sistema imune estar menos preparado (CRUZ, 1985; LARONE, 2011; REIS-GOMES, 2012).

O período de incubação dá-se em torno de 7-28 dias, sua transmissão pode ocorrer através de fômites, solos com contaminação e contato direto com animais infectados. As lesões são caracterizadas por alopecia descamativa e quando presente reação inflamatória mais acerbada pode apresentar hiperpigmentação com as bordas da lesão levemente aumentadas (CRUZ, 1985; LARSSON, 1988).

O diagnóstico é realizado através do conjunto: anamnese, tipo de lesão encontrada e crescimento e identificação em cultura fúngica. Sendo a coleta realizada com a assepsia recomendada e é facilmente isolada em laboratório. Em um estudo realizado no Paraná, entre os casos de dermatopatias a dermatofitose foi a terceira que mais acometeu cães e gatos na clínica de pequenos animais, ficando atrás das dermatites

bacterianas e parasitárias (CARDOSO et al., 2011).

O tratamento para dermatofitose pode ser através de tosa, descontaminação do local e assim como banho utilizando antissépticos tópicos acrescidos de antifúngicos. Nas terapias tópicas podem ser utilizados antifúngicos como miconazol e enilconazol em associação ou separadamente. Em casos recorrentes pode utilizar-se a terapia sistêmica, onde é indicado o uso clotrimazol 1%, que atua principalmente na alteração da permeabilidade de membrana e na síntese do ergosterol e outros ésteres de membrana ou griseofulvina que atua como fungistático (CLAUDINO et al., 2012; NOBRE et al., 2002; MORIELLO, 2004; REIS-GOMES; 2012),

3.4.Esporotricose

A esporotricose é uma doença causada por fungos do Complexo *Sporothrix*, é uma micose de implantação que acomete humanos e diversas espécies animais. Esse Complexo compreende seis espécies, sendo elas *S. albicans*, *S. brasiliensis*, *S. mexicana*, *S. lurei*, *S. schenckii* e *S. globosa* (MANIMON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2014). É um fungo saprofítico que prefere solos com intensa quantidade de matéria orgânica ficando em locais com matéria em decomposição e cascas de árvores, sendo transmitido através da inoculação traumática de seus conídios (CRUZ, 2011; LACAZ et al., 2002).

É uma micose reconhecida mundialmente, no Brasil as regiões onde há mais relato da doença, na qual ela tornou-se endêmica e importante problema de saúde pública, são Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul (MADRID et al., 2010; BARROS et al., 2001). Anteriormente, a doença era reconhecida como doença dos floristas, justamente pelo contato com os espinhos da rosa que realizavam inoculação traumática, quando em contato solo contaminado (BRAUNWALD et al., 2013), porém atualmente sabe-se que nas regiões endêmicas do Brasil o principal tipo de transmissão está intimamente relacionado com a mordedura e arranhadura de felinos, espécie de maior importância na cadeia de transmissão tanto zoonótica quanto inter-espécies (CRUZ, 2011; MADRID et al., 2011). Devido ao hábito de afiar as unhas e cavar na terra para tapar as fezes, os felinos são mais propensos a albergar os conídios nas garras, sendo capazes de transmitir a doença para outros animais e humanos através de brigas e/ou brincadeiras envolvendo arranhaduras. Apesar dos felinos e humanos serem as espécies

em foco, já foram relatados casos de esporotricose em golfinhos, bovinos, roedores, raposas, lagomorfos, tatus e equinos (CRUZ, 2011; LARSSON, 2011).

Os fungos do Complexo *Sporothrix* apresentam morfologia dimórfica, visualizando-se leveduriforme quando em parasitismo e filamentosa quando no meio ambiente. Quando ocorre a infecção pela forma filamentosa, 24 a 48 horas após a inoculação não há mais hifas ocorrendo a transição completa para forma leveduriforme em torno de 13 dias. Ocorrendo assim um período de incubação maior quando adquirido do ambiente que adquirido pela transmissão direta de animais, onde o fungo encontra-se na fase leveduriforme (MEIRELES & NASCENTE, 2009; CRUZ, 1985; CRUZ, 2011).

A apresentação da doença está ligada a imunidade do hospedeiro, podendo essa auxiliar na permanência ou crescimento da lesão e até a cura espontânea. Porém a eficiência imunológica fica comprometida devido aos fatores de patogenicidade adquiridas pelo fungo, tais como constituintes da parede celular, termotolerância, enzimas extracelulares e produção de melanina (LARSSON, 2011; MADRID et al., 2007). As apresentações clínicas ocorrem através das formas cutânea-linfática, cutânea e fortuitamente na forma sistêmica, apresentando tempo de evolução dependente dos fatores de imunidade e patogenicidade do agente, podendo levar de 2 a 24 meses (LACAZ et al., 2002; MADRID et al., 2010).

Para realização do diagnóstico preciso é necessária a associação da anamnese, sinais clínicos, histórico e isolamento do agente a partir da semeadura em meio de cultura, essa deve ter crescimento em ambas temperaturas (ambiente a aproximadamente 25°C e corporal a aproximadamente 37°C) para confirmação do dimorfismo (MEIRELES & NASCENTE, 2009). Primordialmente, os primeiros fármacos a serem utilizados para o tratamento da esporotricose foram iodeto de sódio e iodeto de potássio. Devido a sensibilidade dos felinos a iodetos em geral, esse fármaco foi alterado por derivados azóis que agem substancialmente no ergosterol, componente da membrana celular (SHUBACH et al., 2004; NOBRE et al., 2002). Após diversas experiências com drogas antifúngicas como cetoconazol, flucitosina e anfotericina B, umas apresentaram diversos casos de efeitos colaterais e outras não eram mais utilizadas devido ao alto custo e período prolongado de tratamento (NOBRE et al., 2002; SCHUBACH et al., 2004; HEIT & RIVIERE, 1995). Atualmente, o fármaco de eleição para o tratamento da esporotricose é um derivado de triazólico, o itraconazol,

recomendado na dose de 10-40mg/kg ao dia, por via oral e com duração mínima de três meses de tratamento (MADRID et al., 2007; SCHUBACH et al., 2004).

3.5.Candidose

A candidose é uma doença micótica causada por fungos do gênero *Candida*, micro-organismos comensais presentes em mucosa e pele. São leveduras oportunistas que cometem principalmente indivíduos imunodeprimidos e também aqueles que possuem alguma doença crônica, causando lesões cutânea úmidas, eritematosas com erosões e em formato placóide de coloração esbranquiçada acometendo mucosas, junções mucocutâneas e locais com umidade persistente, podendo também apresentar caráter sistêmico (CRUZ, 1985; WILLEMSE, 1994; MEIRELES & NASCENTE; 2009).

Dentro do gênero encontram-se as *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*, *C. curvata*, *C. lambica*, *C. rugosa*, *C. humicola*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dublinensis*, *C. famata*, *C. lusitaniae*, *C. stellatoidea*, que são as principais espécies. O diagnóstico se dá através do cultivo celular em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e possui célere crescimento, sendo ele entre 24-48h formando colônias de coloração branco a creme com textura cremosa. Microscopicamente são identificados os blastoconídeos com formatos de esféricos à ovais de 3 a 5µm de diâmetro, paredes delgadas e não apresenta cápsula, a identificação de espécie pode ser realizada através de testes bioquímicos como assimilação de açúcares, fermentação de carboidratos e presença ou não de pseudo-hifas ou hifas verdadeiras, destacando-se a *C. albicans*, espécie mais envolvida em casos de candidose em mamíferos (LACAZ, 2002; SIDRIM & MOREIRA, 1999; RIPPON, 1988).

Apesar da colonização do fungo não denotar doença, a alta concentração de leveduras e principalmente doenças agregadas ao paciente como: transplantados, pacientes oncológicos que fazem uso de antineoplásicos, uso prolongado de antimicrobianos e anti-inflamatórios não esteroidais, alterações na barreira primária da pele, doenças metabólicas e uso prolongado de dispositivos intravenosos fazem com que a doença se instaure e até mesmo evolua causando lesões mais graves ou tornando-se sistêmica. (SIDRIM & MOREIRA, 1999; CLEFF et al., 2007; FERREIRO et al., 2002; RODRIGUEZ et al., 2003)

A fixação e penetração da *Candida* spp. em tecidos está intimamente ligado aos fatores de virulência, sendo capazes de ligar-se às membranas celulares do hospedeiro em locais como mucosa oral e vaginal, córnea, plaquetas, endotélio vascular e sistema gastrointestinal. Essa aderência se dá através dos componentes glicoproteicos presentes na parede celular das leveduras que proporciona a inflamação ativando a via alternativa do complemento (LACAZ, 2002; ZIARRUSTA, 2002).

Os relatos de candidose vêm tornando-se recorrente na clínica de pequenos animais, com sinais clínicos de dermatite mucocutânea disseminada ou localizada, piodermatite de comissuras labiais e em pele sendo descrito lesões úmidas, presença de prurido, pápulas, pústulas e podendo evoluir para ulcerações do tecido acometido (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2006). Na espécie canina, a *Candida* spp. possui favoritismo pelas mucosas, interdígitos e junções mucocutâneas, podendo-se observar lesões ulceradas, placóides de exsudato esbranquiçado. Áreas de intensa umidade também são de eleição para a *Candida* spp. como orelhas e meato acústico externo (GUILLOT et al., 1996; RAPOSO, et al., 1996; WILLEMSE, 1995).

Com base na epidemiologia, sinais clínicos, apresentação de lesões e exame direto do material coletado é possível chegar-se ao diagnóstico presuntivo. Microscopicamente aparecerão células arredondadas ou ovaladas com presença de hifas e brotamentos (SIDRIM & MOREIRA, 1999; KNOW-CHUNG & BENNETT, 1992). Para o diagnóstico definitivo o método de eleição é cultivo em agar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, de 24-48 horas acondicionados em temperatura de 35-37°C. Após o crescimento, as leveduras podem ser identificadas microscopicamente e sua espécie pode ser revelada através de provas bioquímicas, repiques em meios de cultura específicos, testes de termotolerância e prova do tubo germinativo (LACAZ, 2002; SIDRIM & MOREIRA, 1999).

4. ARTIGO CIENTÍFICO

4.1. Artigo I

Delineamento de suscetibilidade *in vitro* de extratos aquosos de *Olea europaea* frente a fungos filamentosos e leveduriformes.

Márcia Kutscher Ripoll¹, Stefanie Bressan Waller², Otávia de Almeida Martins², Luiza da Gama Osório³, Renata Osório de Faria⁴, Mario Carlos Araujo Meireles⁴, Rogério de Oliveira Jorge⁵, Fabio Clasen Chaves⁶, João Roberto Braga de Mello⁷.

Artigo formatado nas normas da revista *Microbial Pathogenesis*.

O texto será traduzido para a língua inglesa para submissão.

Delineamento de suscetibilidade *in vitro* de extratos aquosos de *Olea europaea* frente a fungos filamentosos e leveduriformes.

**Márcia Kutscher Ripoll¹, Stefanie Bressan Waller², Otávia de Almeida Martins²,
Luiza da Gama Osório³, Renata Osório de Faria⁴, Mario Carlos Araujo Meireles⁴,
Rogério de Oliveira Jorge⁵, Fabio Clasen Chaves⁶, João Roberto Braga de Mello⁷.**

¹Mestranda em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

²Doutoranda em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

³PNPD pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁴Faculdade de Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Setor de Micologia na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁵Responsável Técnico na EMBAPA - Cascata.

⁶Faculdade de Agronomia, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial na Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil.

⁷Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Departamento de Farmacologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

***Correspondência:** M.V. Márcia Kutscher Ripoll

Setor de Micologia, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária,
Universidade Federal de Pelotas,

Email marciaripoll@hotmail.com

Resumo

A oliveira é conhecida e amplamente utilizada na medicina popular brasileira no tratamento de infecções e diminuição de sinais clínicos, os extratos de oliveira são reconhecidos por apresentarem atividade antifúngica frente a diversos agentes patogênicos e por auxiliar na restauração de tecidos lesados. Ainda que, a disponibilidade de antimicrobianos seja ampla, o número de antifúngicos é irrisório quando comparado com a quantidade de antibacterianos disponíveis no mercado. O presente estudo avaliou o perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos e cepas padrões de *Candida* spp. e *Sporothrix* spp., e isolados de *M. canis* e *M. gypseum*, bem como o fator de toxicidade celular dos extratos e a presença dos principais compostos fenólicos. A metodologia para os testes de sensibilidade *in vitro* foi utilizado o documento M27-A3 preconizado pelo CLSI para as leveduras e protocolo M38-A2, para fungos filamentosos, ambos adaptados para uso de fitoterápicos. O teste de viabilidade celular em MDBK e CLAE para identificação dos compostos. De acordo com o teste de suscetibilidade *in vitro* de duas cepas padrões de *C. albicans* (ATCC 14053 e IOC 3691) foram sensíveis a partir da concentração de 50 mg/mL dos extratos de bagaço em DEC 10', com baixa toxicidade em MDBK, obtendo-se 15 a 50% de viabilidade a partir de 25 mg/mL e a CLAE revelou presença de oleuropeína e hidroxitirosol principalmente nos extratos coratina, kororneiki e picual, principais variedades que inibiram as cepas de *Candida* spp. Para os testes com *Sporothrix* e dermatófitos, não demonstrou eficiência frente aos patógenos testados. Nas condições experimentais, permitiu concluir que os extratos não apresentaram atividade antimicrobiana esperada, entretanto duas cepas de *Candida* spp. foram sensíveis. Os extratos aquosos das sete variedades de azeitona, não foram citotóxicos e algumas variedades revelaram presença de oleuropeína, porém a quantidade não foi capaz de realizar a inibição de mais isolados.

Palavras-chaves: Fungos, Teste de suscetibilidade, Antifúngico, *Olea europaea*.

Introdução

Pertencente à família das *Oleaceae*, a *Olea europaea* é a única dentre a família a produzir fruto comestível, a azeitona, a qual utiliza-se para realização da extração do azeite. No momento atual, o plantio das oliveiras dá-se em regiões que possuem verões quentes e seco, forte insolação e com presença de precipitações moderadas e invernos amenos. Podendo ser plantada e cultivada em regiões de clima temperado ou subtropical, caracterizados por verões de perfil citados anteriormente e também com baixas temperaturas no inverno, facilitando sua floração. É considerado um dos cultivos mais antigos e no Brasil sua produção tem destaque nas regiões Sul e Sudeste [1]. O fator climático no sul do Brasil agrega positivamente para o cultivo das oliveiras, onde a variação de temperatura anual fica na média de 17°C e 24°C, tornando atrativo e viável seu plantio, posto que a temperatura ideal para o crescimento e frutificação da oliveira está entre 10°C e 30°C [2] [3].

Com aproximadamente 98% da composição do azeite estão os ácidos graxos [4], dentre eles os ácido oleico, importante auxiliar na redução de doenças da artéria coronária [5] [6]. Além de ácidos graxos, carotenoides e tocoferóis também estão presentes na composição [7] [8], assim como os fenóis que podem ser divididos em fenóis simples, secoiridoides e lignanas, responsáveis por inúmeros benefícios à saúde [9]. Os compostos fenólicos, principalmente a oleuropeína e hidroxitirosol, entre outros elementos químicos são conhecidos pela sua ação antimicrobiana [10] [11] [12], anti-inflamatória [13] [14], antinociceptiva [13], anticarcinogênica [15], antioxidante [16] e crioprotetora [17]. Seus extratos são reconhecidos por apresentarem atividade antifúngica frente a agentes patogênicos e por dar suporte às recuperações realizando cicatrização de tecidos lesionados [11] [18].

As enfermidades fúngicas apresentam-se cada vez mais frequente na clinica de pequenos animais, principalmente pela resistência aos antimicrobianos usuais e devido à enfermidade que causam imunossupressão nos pacientes [19] [20]. Entre estas, destacam-se as dermatofitoses, a esporotricose e a candidose, a primeira micose caracteriza-se por uma doença oportunista causada por um grupo de fungos pertencentes aos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton* [21]. Na clinica de pequenos animais, os principais causadores desta infecção são *M. canis* e *M. gypseum* [22]. O tratamento das dermatofitoses normalmente é demorado, sendo muitas vezes necessário combinações de fármacos com diversos mecanismos de ação até obter-se a cura total [23], considerando relatos de casos de resistência aos fármacos de eleição para o tratamento [24]. Além de casos que apresentam resistência a antifungicos e são recorrentes, deve-se considerar também sua toxicidade exacerbada, que resulta em efeitos colaterais não desejados [25].

A esporotricose é considerada uma zoonose endêmica no Brasil e de alta prevalência em felinos e humanos, caracterizando assim, um problema de saúde pública no país [26]. A resistência aos fármacos de eleição para o tratamento é resultante de falhas terapêuticas no processo de recuperação dos animais e posterior reaparecimento de lesões ulcerativas que tendem a evoluir e espalhar-se através de vasos linfáticos. O habito dos felinos de enterrar fezes, arranhar cascas de árvores, disputar por território associado aos fatores farmacológicos citados anteriormente faz com que ocorra elevado número de casos desta micose [20] [27] [28]. Já os fungos do gênero *Candida* contemplam centenas de espécies, sendo a *Candida albicans* a de maior importância devido a freqüente ocorrência tanto em humanos quanto animais. É um agente de caráter oportunista e está presente como comensal nas mucosas de cerca de 50% da

população de indivíduos saudáveis. Normalmente a causa da doença está associada a um desequilíbrio entre os micro-organismos presentes nas mucosas comumente causado por uso de antibióticos por períodos prolongados, deficiência imunológica do hospedeiro, uso exacerbado de corticoides ou imunodeficiências decorrentes de doenças crônicas. Diversos fármacos antifúngicos são indicados no tratamento da candidose, sendo os principais os derivados azólicos como o fluconazol e itraconazol, de baixo efeito tóxico e amplo espectro de ação. Também são utilizados os polienos, fluoropirimidinas e para cepas com resistência aos fármacos anteriores são utilizadas as equinocandinas. Apesar de haver mais de uma possibilidade de fármacos, ainda assim, o número de antifúngicos é irrisório quando comparado com a quantidade de antibacterianos disponíveis no mercado. Além da pouca disponibilidade dos fármacos temos os mecanismos de defesa fúngica que manifestam-se de diferentes formas, como desvios metabólicos, superexpressão ou alteração de alvos farmacológicos ou diminuição da concentração do fármaco [29] [30] [31] [32]. Tendo em vista sanar os problemas de resistência aos fármacos, altos custos dos medicamentos e redução de efeitos colaterais, o conhecimento de plantas medicinais como fontes terapêuticas para tratamentos de micoses apresenta-se uma alternativa farmacológica, onde estudos que usam parte de plantas já foram realizados, comprovando a eficácia da utilização de fitoterápicos como fungicidas e/ou fungistáticos [33] [34] [35] [36].

A partir dessa perspectiva, o objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil de sensibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix* spp., de *Microsporium* spp. e de isolados e cepas padrões de *Candida* spp. frente a extratos aquosos de bagaço de *Olea europaea* L. Assim como testar a toxicidade celular dos extratos utilizados e determinar presença e quantidade dos principais compostos fenólicos.

Material e Métodos

Isolados Fúngicos

No estudo foram utilizados isolados e cepas padrões de diferentes de *Candida*, dentre elas encontram-se as espécies *albicans*, *glabrata* e *tropicalis* totalizando 15 isolados cedidos da micoteca pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MicVet) da Universidade Federal de Pelotas, provenientes de isolamentos obtidos de casos clínicos de cães e gatos. Os isolados foram identificados macro e micromorfológicamente e com auxílio de Vitek MS (bioMérieux) e analisados no Vitek MS IVD system[®] (bioMérieux; Marcy l'Etoile, France). O estoque foi recuperado e mantido sob refrigeração entre 4 a 8°C durante seu uso em experimento. Anteriormente a todos os testes as culturas foram repicadas para ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol e incubadas a 37°C por 48h, para comprovar pureza e viabilidade das colônias. Assim como, utilizados 18 dermatófitos, das espécies *M. canis* e *M. gypseum* e 30 isolados de *Sporothrix* spp, dentre os isolados a espécie *S. brasiliensis*, todos provenientes de casos clínicos de cães e gatos, também recuperados da micoteca do MicVet. Recuperados e mantidos a temperatura ambiente (25°C).

Extratos Aquosos

O estudo foi realizado a partir de 14 extratos aquosos derivados de bagaço, os quais foram divididos em decocção realizada por dez minutos (DEC 10') e infusão por dez minutos (INF 10'), a partir de sete diferentes variedades de oliveiras, sendo elas: arbosana, arbequina, coratina, koroneiki, frontoio, manzanilla e picual. Todos extratos armazenados em frasco âmbar e refrigerados em geladeira.

Teste de Microdiluição em Caldo

O teste suscetibilidade *in vitro* foi realizado conforme as recomendações propostas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) através do protocolo M27-A3 para fungos leveduriforme e seguindo protocolo M38-A2, para fungos filamentosos, adaptados para uso de fitoterápicos [37] [38] [39]. Antecedendo o teste, como preconiza o CLSI, foram realizados os inóculos a partir dos fungos a serem testados. Os testes foram realizados em triplicata, em microplacas de 96 poços de fundo chato, onde se estipulou controle positivo a coluna A e controle negativo coluna H. Nos outros poços (de B a G), foram acrescidos 100µL do produto a ser testado e realizada cinco diluições seriadas permitindo a avaliação das concentrações de 50mg/mL a 1,56 mg/mL, posteriormente foi acrescentado 100 µL do inóculo diluído em sabouraud líquido e solução salina para isolados de dermatófitos, para os do Complexo *Sporothrix* e isolados/cepas de *Candida* spp. foram diluídos em meio RPMI-1640 acrescido de tampão 3-N-ácido morfolinopropanosulfônico (MOPS) e solução salina. Posteriormente incubadas por 48 horas em estufa shaker, com agitação constante e à temperatura de 35°C até a realização da leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que é marcado pela menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico, visualmente. Em seguida foi realizada a leitura da Concentração Fungicida Mínima (CFM), através da semeadura de 10 µl de cada poço em placas de Petri adicionadas de ágar sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. As placas foram incubadas a temperatura de 35°C, para realização da Concentração Inibitória Mínima (CIM).

Teste de Citotoxicidade

A partir de células MDBK (*bovine kidney cells*), cultivadas em RPMI-1640 acrescida de L-glutamina, sem bicarbonato de sódio (pH 7,2) suplementado de

penicilina-estreptomicina e fungizona (PSF) em atmosfera controlada com 5% de CO₂, úmida e a 37°C, o efeito citotóxico foi estabelecido a partir do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5difeniltetrazólico). Adição de tripsina nas células monocamada, suspensas em RPMI-1640, resultando em suspensão com cerca de 2x10⁵ células ml⁻¹. Alíquotas da suspensão celular foram transferidas para poços de microplacas de 96 poços e essas células incubadas juntamente com meio RPMI-1640 acrescido de soro fetal bovino e a 5% de CO₂ por 24 horas na temperatura de 37°C. Posteriormente, 100 µl de cada extrato com suas sucessivas diluições foi acondicionado às microplacas nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,12, 1,56, 0,78 mg/mL sendo essas testadas em triplicata durante 48 hora com atmosfera controlada de 5% de CO₂, úmida e a 37°C.

Sequencialmente, adicionou-se 50 µl da solução MTT a 2,5 mg mL⁻¹ nos poços, incubados a 37°C por duas horas em atmosfera controlada. Em seguida, a solução MTT foi retirada e 50 µl de DMSO (dimetilsufóxido) acrescentado, para desfazer os cristais de formazan, e agitados suavemente por 5 minutos. O monitoramento das células foi realizado a partir de um microscópio invertido, e os resultados expressos em porcentagem de inibição de acordo com as células controle, esta sendo considerada 100%.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

Os materiais usados para realização da análise foram o ácido fórmico Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e acetonitrila de JT Baker (Phillipsburg, NJ, USA). A água ultrapura foi obtida utilizando o sistema de purificação MegaPurity. As análises por LC-QTOF MS foram realizadas em um cromatógrafo líquido (UFLC, Shimadzu, Japão) acoplado a espectrômetro de massas de alta resolução do tipo quadrupolo-tempo de voo (Maxis Impact, Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A separação

cromatográfica foi realizada utilizando uma coluna Bidentate C18 (100 x 2.1 mm, MicroSolv Technology Corporation, Eatontown, NJ, EUA) empregando como fase A água com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e como fase B acetonitrila com 0,1% de ácido fórmico (v/v) e o seguinte programa de gradiente: 5% B (0,0 min), 0-90% B em 0.01-15 min, 90% em 15-18 min e 90-5% B em 18,01-20 min. Depois de cada injeção a coluna foi re-equilibrada por 6 minutos utilizando a composição do solvente inicial. Para todas as análises foi injetado 10 µL de extrato previamente filtrado em membrana de nylon de 0,2µm, empregado um fluxo constante de 0,2 mL min⁻¹ e a temperatura da coluna foi mantida a 40°C. O espectrômetro de massas foi operado no modo ESI negativo utilizando os seguintes parâmetros: voltagem do capilar, +4000V; pressão do gás de nebulização (N₂), 2 bar; fluxo do gás de secagem, 8 L min⁻¹, temperatura da fonte, 180°C; colisão de RF, 150 Vpp; transfer, 70 mS e armazenamento pré-pulso de 5 mS. Os espectros de massas foram adquiridos em um rango de 50 a 1200 m/z a 4 espectros/s para ambos modos de ionização. As análises MS/MS foram obtidas por fragmentação automática empregando os seguintes valores de energia de colisão: m/z 100, 15 eV; m/z 500, 35 eV; m/z 1000, 50 eV e usando N₂ como gás de colisão. A calibração externa foi realizada utilizando Formiato de sódio 10Mm como calibrante, cobrindo toda a faixa de aquisição de 50-1200 m/z. A concentração de hidroxitirosol e oleuropeína foi determinada de forma semi-quantitativa com base no sinal analítico do padrão interno (reserpina) adicionado a cada amostra (concentração final 4 µg mL⁻¹). Os íons monitorizados foram: hidroxitirosol ([M- H]⁻ m/z 153,0546) e oleuropeína ([M - H]⁻ m/z 539,1759).

Resultados

Compostos presentes nos frutos de azeitona possuem ação antimicrobiana tanto

de forma sinérgica ou isolada [40] [41], contudo, no presente estudo não foi observado atividade antifúngica desses extratos aquosos diante dos isolados de dermatófitos e de *Sporothrix* spp. E dos 15 isolados testados para susceptibilidade *in vitro*, dois isolados de *Candida* foram sensíveis ao extrato de decocção do bagaço de *Olea europaea*. As *Candidas* que apresentaram sensibilidade pertenciam à espécie *albicans*, sendo uma *American Type Culture Collection* 14053 (ATCC) e a outra do Instituto Oswaldo Cruz 3691 (IOC), apresentaram susceptibilidade a partir da concentração de 50mg/mL de DEC 10' do extrato de bagaço de oliveira. Já para o extrato em INF 10' não obteve resultado inibitório de nenhum isolado testado. A inibição da ATCC 14053 diante da DEC 10' ocorreu nas sete variedades testadas, já na IOC 3691 não foi eficiente nas variedades arbosana e frontoio, conforme Tabela 1.

Extrato DEC10' <i>Olea europaea</i>	<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	<i>C. albicans</i> (IOC 3691)
Arbequina	25 mg/mL	25 mg/mL
Arbosana	25 mg/mL	SI
Coratina	25 mg/mL	3,12 mg/mL
Frontoio	50 mg/mL	SI
Koroneiki	25 mg/mL	3,12 mg/mL
Manzanilla	50 mg/mL	25 mg/mL
Picual	25 mg/mL	3,12 mg/mL

SI – Sem inibição

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM) apresentada no teste *In vitro* do extrato de decocção 10' frente a fungos do gênero *Candida* spp.

O extrato DEC 10' também apresentou ação antifúngica *in vitro* frente ao isolados testados, exceto para as variedades arbosana e frontoio tentadas frente a *C.*

albicans IOC 3691, conforme ilustrado na tabela 2.

Extrato DEC10' <i>Olea europaea</i>	<i>C. albicans</i> (ATCC 14053)	<i>C. albicans</i> (IOC 3691)
Arbequina	50 mg/mL	50 mg/mL
Arbosana	25 mg/mL	SI
Coratina	50 mg/mL	25 mg/mL
Frontoio	50 mg/mL	SI
Koroneiki	25 mg/mL	12,5 mg/mL
Manzanilla	50 mg/mL	50 mg/mL
Picual	25 mg/mL	12,5 mg/mL

SI – Sem inibição

Tabela 2: Concentração Fungicida Mínima (CFM) apresentada no teste *In vitro* do extrato de decocção 10' frente a fungos do gênero *Candida* spp.

A viabilidade celular dos extratos variou de 15 a 50% apresentando resultados satisfatórios, pois preservaram, nas concentrações testadas, a viabilidade das células MDBK nos extratos a partir da concentração de 50mg/mL (Figura 1 e 2).

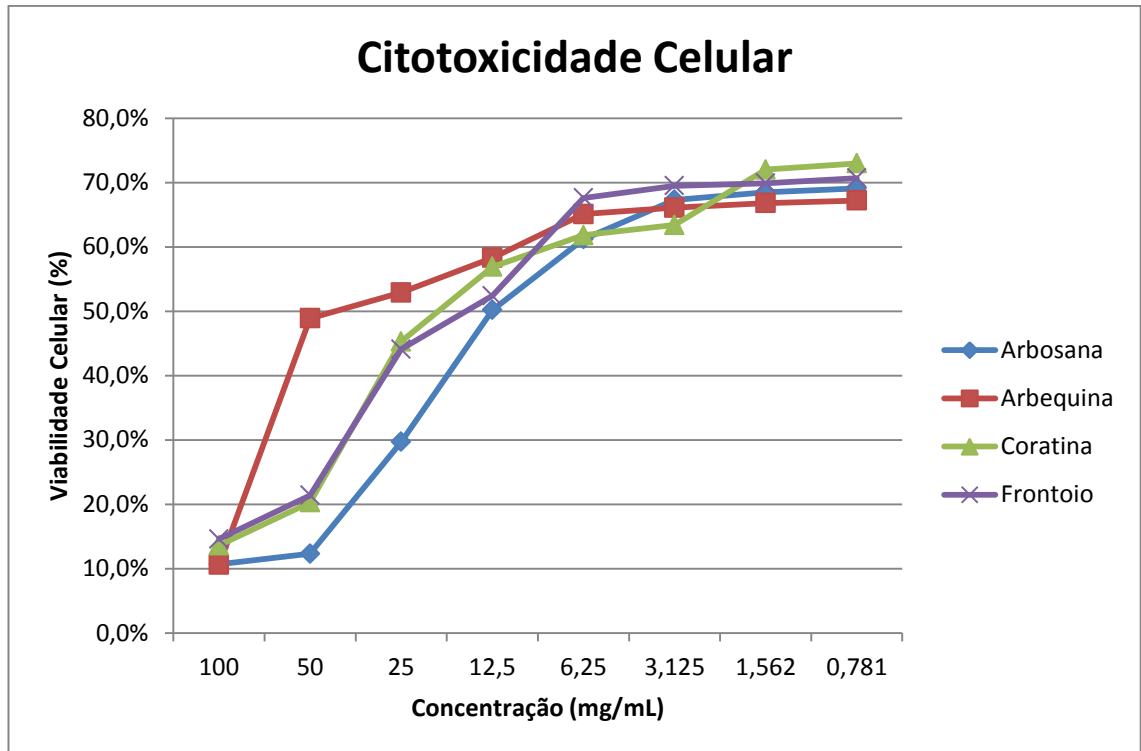


Figura 1: Viabilidade celular frente a extratos de Arbosana, Arbequina, Coratina e Frontoio em DEC 10'.

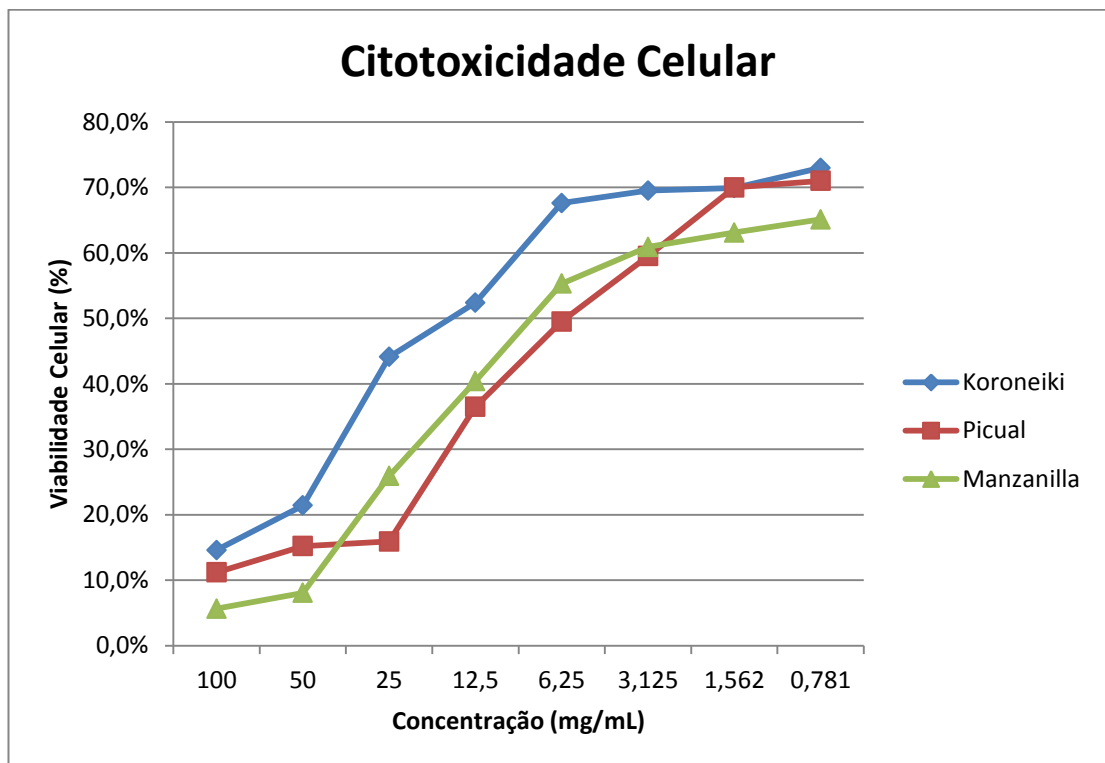


Figura 2: Viabilidade celular frente extratos de Koroneiki, Picual e Manzanilla em DEC 10'.

Os compostos químicos explorados através da CLAE foram oleuropeína e hidroxitirosol, que de acordo com a literatura são os compostos fenólicos que possuem ação antimicrobiana. Hidroxitirosol foi encontrado em diferentes concentrações no extrato, variando de 0,008 a 0,034 mg/mL nos extratos de INF 10' e de 0,011 a 0,081 mg/mL em extratos de DEC 10'. porém no extrato de INF 10' a oleuropeína foi detectada em baixa concentração variando de 0,001 a 0,008 mg/mL, porém ausente nas variedades arbosana, arbequina, frontoio e manzanilla, enquanto que o extrato DEC 10' apresentou oleuropeína nas sete variedade, as concentrações variaram de 0,007 a 0,087 mg/mL, sendo as mais altas observadas nas variedades coratina, koroneiki e picual (Figura 3).

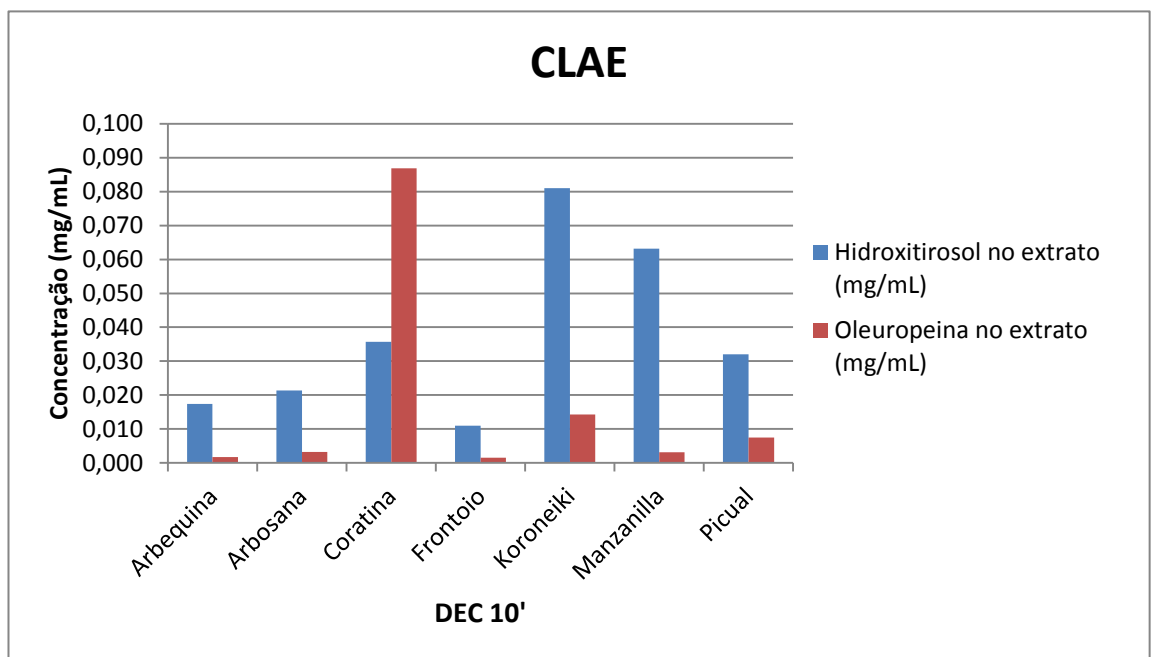


Figura 3: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) de extratos de bagaço decocção 10'.

Discussão

Diversos extratos de oliveira já foram testados frente a bactérias e fungos,

obtendo resultados promissores como extratos aquosos de folha de oliveira frente isolados clínicos de bactérias e fungos filamentosos [42], sinergismo de compostos fenólicos da folha frente a bactérias [43][44], aldeídos alifáticos frente a isolados e padrões de bactérias [45] [18], nanopartículas de prata biossintetizadas a partir de extrato aquoso de oliveira frente bactérias [46], extratos comerciais de folhas de oliveira frente a bactérias e fungos leveduriforme [47]. Outros autores testaram isoladamente a atividade de compostos específicos presentes em diversas partes da oliveira, testando a oleuropeína notaram atividade inibitórias frente a *Mycoplasma pneumoniae*, *M. pirum*, *M. hominis* e *M. fermentans* encontrando valores de CIM respectivamente de 0,36, 0,32, 0,02 e 0,02 µg/mL [48]. Estudos utilizando extrato bruto de polifenóis e com hidroxitirosol isolado apresentaram atividade, porém em baixa escala diante de *Listeria monocytogenes* [49].

Estudos avaliando eficiência de extratos de folha de oliveira diante de *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*, observaram atividade antimicrobiana em todos os isolados, de maneira que os extratos evitaram o crescimento na menor concentração utilizada no teste [50].

Segundo Zoric et al. (2013) [11], em seu estudo corroboraram com um estudo realizado por Battinelli et al. (2006) [18], testando aldeídos alifáticos, extraídos da azeitona, sobre isolados de *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida* spp., *Microsporum canis*, verificando eficiente ação antifúngica nos dermatófitos testados, porém, não apresentando boa atividade frente isolados de *Candida* spp., assim como foi verificado nos extratos aquosos de INF 10' para isolados de *Sporothrix* spp., dermatófitos e

Candida spp. do presente estudo. Divergindo do que foi obtido nesse estudo para extratos, autores têm apresentado dados de que a oliveira e seus extratos têm ação antimicrobiana frente a fungos patogênicos e que pode evoluir para avaliação *in vivo* e posteriormente ser utilizado na terapêutica de doenças fúngicas seja isolado ou em associação a fármacos presentes no mercado, entretanto, apenas após a elucidação do mecanismo de ação dos seus compostos bioativos [51].

Ao contrário do extrato de INF 10', o extrato de DEC10' de bagaço de oliveira, partir desse estudo, observou atividade antimicrobiana demonstrando-se eficiente frente a dois isolados padrões de *Candida albicans*, esse resultado em comparação aos resultados obtidos por Sudjana et al. (2009) [47], que apesar de ter utilizado isolados de *Candidas* de outras espécies além da *albicans*, essas foram as mais susceptíveis. Porém, possivelmente nossos resultados não foram tão próximos e não inibiram mais isolados, porque no estudo em questão foram utilizados outros tipos de extratos, do óleo de folhas de oliveira, enquanto que o nosso foi realizado a partir de extratos aquosos do bagaço.

Estudos que confirmam a prerrogativa de que os compostos fenólicos presumivelmente são os que possuem boa atividade frente a fungos do gênero *Candida* Batinelli et al. (2006) [19], não obteve ação inibitória, nem antifúngica em sete isolados de *Candida*, sendo o composto testado os aldeídos alifáticos do fruto de *Olea europaea*, esses compostos se diferenciam pela composição química, onde os alifáticos não apresentam anel de benzeno e os fenólicos que apresentam a estrutura hidroxila ligada a um anel aromático.

No estudo os extratos apresentaram baixa atividade frente ao gênero *Candida*, onde treze dos quinze isolados não foram inibidos pelo extrato aquoso DEC 10', enquanto no extrato aquoso INF 10' nenhum dos isolados foi inibido, isso deu-se

provavelmente, segundo Korukluoglu et al. (2006) [33], pela forma de obtenção dos referidos extratos que devido a altas temperaturas para sua obtenção a fração não polar desses compostos evaporam e por fim não apresentam atividade esperada. Entretanto, esse mesmo autor afirma a partir de diversas extrações com outros solventes como álcool, cetona e acetato de etila demonstraram atividade inibitória e antifúngica. O presente estudo mostrou que apesar de os extratos serem expostos ao calor, ainda sim alguns seguiram apresentado compostos fenólicos, em baixas quantidades. Os isolados que apresentaram sensibilidade podem diferenciar-se dos outros em diversos aspectos como grau de patogenicidade, que explica porque ser efetivo em certos isolados e não efetivo em outros. A quantidade dos compostos fenólicos encontrados parece interferir na atividade antimicrobiana, onde os extratos de DEC 10' que possuíam maior quantidade de oleuropeína, variando de 0,087 a 0,007 mg/mL, foram os extratos que melhor inibiram os isolados e que também apresentam ação antifúngica. Já os compostos que obtiveram concentração de oleuropeína menor que 0,002 mg/mL não apresentaram atividade.

Considerar o tipo de extrato é importante, pois os mesmos podem variar na constituição e quantidade de composto presente, dependente do tipo de extração utilizada entre outros fatores de acordo com características da planta, solo, umidade, colheita, e época do ano. É importante salientar que, de acordo com o tipo de extrato, as concentrações dos seus constituintes podem variar e essas diferenças de quantidade e tipo de composto explica o por quê de alguns autores verificarem atividade antimicrobiana do produto enquanto outros não [5]. Segundo Korukluoglu et al. (2006) [33] a obtenção dos extratos aquosos do bagaço que são submetido a altas temperaturas para sua obtenção interferiria na fração apolar desses compostos, evaporando e por fim

não apresentando a atividade esperada. Esse mesmo autor afirma que a obtenção a partir de diversas extrações com outros solventes como álcool, cetona e acetato de etila demonstraram atividade inibitória e antifúngica. Mesmo após essas considerações, o presente estudo mostrou que apesar de os extratos serem expostos ao calor, ainda sim alguns apresentaram compostos fenólicos em baixas quantidades, que pode estar relacionado com a não inibição nos testes *in vitro* apresentados.

Um estudo que abordou a capacidade de extratos de oliveira atuarem na proteção celular em estresse oxidativo, após identificar grande variação na eficácia dos produtos relacionado a composição e concentração de derivados presente nos extratos. Indicando que a variação da eficácia pode dar-se de acordo com o tipo de extrato utilizado e o tipo de extração realizada, assim como seus compostos majoritários [52]. Assim, pressupõe-se que, entre outros fatores, os extratos de bagaço de *O. europaea* testados não apresentaram atividade antifúngica por já terem passado por diversos processos de extração, obtendo assim menor teor de compostos bioativos [53] [54] devido a esses processamentos realizados no produto inicial e também a baixa concentração utilizada nos testes.

Segundo a literatura consultada não foram encontradas referências sobre a utilização de extratos aquosos a partir do bagaço (matéria resultante do processamento da indústria do azeite), portanto é um estudo pioneiro, pois é o primeiro a utilizar esse tipo de substrato da olivicultura para realização dos testes de sensibilidade *in vitro* e também em testes de citotoxicidade celular.

Conclusão

O estudo demonstra que o extrato de DEC 10' foi efetivo frente a dois isolados padrões de *C. albicans*, a partir de concentrações de 50mg/mL, apesar de não possuir valor estatístico, pode-se aprimorar as quantidades utilizadas, visto que na comparação de extratos os efetivos foram o que obtiveram maiores concentrações de oleuropeína, conforme demonstra a CLAE. O trabalho também verificou que os extratos aquosos de bagaço a 10 minutos de *O. europaea* não foram eficientes para eliminar e/ou inibir o crescimento fúngico, quando se trata de isolados de dermatófitos e isolados de *Sporothrix* spp. A viabilidade celular variou de 15 a 50% em extratos de DEC 10' com concentrações a partir de 25mg/mL, que foi efetivo frente a duas cepas. Os extratos de INF 10' não inibiram frente as cepas em nenhuma das concentrações testadas (de 50 a 0,078 mg/mL) apesar de apresentarem oleuropeína e hidroxitirosol, exceto nas variedades arbequina, arbosana, frontoio e manzanilla em que não revelou presença de oleuropeína. Nos extratos de DEC 10' obteve-se concentrações de 0,007 a 0,087 mg/mL, O hidroxitirosol variou em 0,008 a 0,034 mg/mL nos extratos de INF 10' e de 0,011 a 0,081 mg/mL em extratos de DEC 10', concentrações que não obtiveram resultados satisfatório frente a ação antimicrobiana nos isolados testados, A partir de mais estudos e através da calibração das concentrações os extratos aquosos de bagaço podem ser promissores e auxiliar em terapias antifúngicas, não só pela sua atividade antimicrobiana, mas também outras atividades benéficas dos extratos como a baixa citotoxicidade celular.

Agradecimentos

Os autores agradecem a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) pelo auxílio financeiro. Assim como à Universidade Federal do Rio Grande do Sul pelo apoio através do Departamento de Farmacologia.

Conflito de interesse: Não há conflito de interesses.

Referências

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3]. Coutinho, E. F., Ribeiro, F. C., Cappellaro, T. H. *Cultivo de Oliveira (Olea europaea L.)*. Pelotas – RS, 2009
- [4] Luchetti, F. *Importance and future of olive oil in the world market – na introduction to olive oil*. European Journal of Lipid Science and Technology. v. 104, p. 559-563, 2002.
- [5] Cunha, S. C.; Amaral, J. S.; Fernandes, J. O.; Oliveira, M. B. P. P. *Quantification of Tocopherols and Tocotrienols in Portuguese Olive Oils Using HPLC with Three Different Detection Systems*. Journal os Agricultural ans Food Chemistry. v. 54, n. 9, p. 3351-3356, 2006.
- [6] Boateng, L.; Ansong, R.; Owusu, W. B.; Steiner-Asiedu, M. *Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review*. Ghana Medical Journal. v. 50, n. 3, p. 189-196, 2016.
- [7] Giuffrida, D.; Salvo, F.; Salvo, A.; La Pera, L.; Dugo, G. *Pigments composition in monovarietal virgin olive oils from various sicilian olive varieties*. Journal Food Chemistry. v. 101, p. 833-837, 2007.
- [8] Gandul-Rojas, B.; Minguez-MOSQUERA, M. I. *Chlorophyll and carotenoid composition in virgin olive oils from various Spanish olive varieties*. Journal of

the Science of Food and Agriculture. v. 72, p. 31-39, 1996.

- [9] Waterman, E.; Lockwood, B. *Active components and clinical applications of olive oil*. *Alternative Medicine Review*. v. 12, n. 4, p. 331-342, 2007.
- [10] Nunes, M. A., Costa, A. S., Bessada, S., Santos, J., Puga, H., Alves, R. C. & Oliveira, M. B. P. 2018. *Olive pomace as a valuable source of bioactive compounds: A study regarding its lipid-and water-soluble components*. *Science of The Total Environment*, 644, p. 229-236.
- [11] Zoric, N., Horvat, I., Kopjar, N., Vucemilovic, A., Kremer, D., Tomic, S., & Kosalec, I. 2013. *Hydroxytyrosol expresses antifungal activity in vitro*. *Current drug targets*, **14**(9), p. 992-998.
- [12] Goel, N., Rohilla, H., Singh, G., & Punia, P. 2016. *Antifungal activity of cinnamon oil and olive oil against Candida Spp. isolated from blood stream infections*. *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, **10**(8), DC09.
- [13] Eidi, A., Moghadam-kia, S., Moghadam, J. Z., Eidi, M., & Rezazadeh, S. 2012. *Antinociceptive and anti-inflammatory effects of olive oil (Olea europaea L.) in mice*. *Pharmaceutical biology*, **50**(3), 332-337.
- [14] Kim, Y. H., Choi, Y. J., Kang, M. K., Lee, E. J., Kim, D. Y., Oh, H., & Kang, Y. H. (2018). *Oleuropein Curtails Pulmonary Inflammation and Tissue Destruction in Models of Experimental Asthma and Emphysema*. *Journal of agricultural and food chemistry*, **66**(29), 7643-7654.
- [15] Imran, M., Nadeem, M., Gilani, S. A., Khan, S., Sajid, M. W., & Amir, R. M. 2018. *Antitumor Perspectives of Oleuropein and Its Metabolite Hydroxytyrosol: Recent Updates*. *Journal of food science*.
- [16] Aly, F. M., Othman, A., & Haridy, M. A. 2018. *Protective Effects of Fullerene C60 Nanoparticles and Virgin Olive Oil against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats*. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- [17] Aree, T., & Jongrungruangchok, S. 2018. *Structure–antioxidant activity relationship of β -cyclodextrin inclusion complexes with olive tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein: Deep insights from X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay*. *Carbohydrate polymers*, **199**, p. 661-669.
- [18] Battinelli, L., Daniele, C., Cristiani, M., Bisignano, G., Saija, A., & Mazzanti, G. 2006. *In vitro antifungal and anti-elastase activity of some aliphatic aldehydes from Olea europaea L. fruit*. *Phytotherapy*, **13**(8), 558-563.
- [19] Lacaz, C. S.; Porto, E.; Martins, J. E. C. *Tratado de Micologia Médica - Lacaz*. 9.ed. São Paulo: Sarvier, 1104p. 2002.

- [20] 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 Brazil*. Medical mycology, 52(1), 56-64, 2013.
- [21] Meireles M.C.A. & Nascente P.S. *Micologia Veterinária*. Ed. Universitária UFPEL, Pelotas, p.456, 2009.
- [22] Reis-Gomes, A. *Estudo retrospectivo das micoses e micotoxicoses animais na região sul do Brasil*. 95f. 2012. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2012.
- [23] Gupta, A. K.; Cooper, E. A. *Update in antifungal therapy of dermatophytosis*. *Mycopathologia*. v. 166, p. 353-367, 2008.
- [24] Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N. S., Ghannoum, M. A. *Clinical Trichophyton rubrum Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, n. 1, p. 82-86, 2003.
- [25] Zacchino, S. *Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos*. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*. Chapecó: Argos, p. 435-479, 2001.
- [26] Poester, V. R.; Mattei, A. S.; Madrid, I. M.; Pereira, J. T. B.; Klafke, G. B.; Sanhotene, 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.
- [27] Waller, S. B., Cleff, M. B., Serra, E. F., Silva, A. L., dos Reis Gomes, A., de Mello, J. R. B. & Meireles, M. C. A. *Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine*. *Microbial pathogenesis*, 104, 232-237, 2017.
- [28] Rodrigues, A.M.; De Hoog, G.; Zhang, Y.; Camargo, Z. P. *Emerging sporotrichosis is driven by clonal and recombinant Sporothrix species*. *Emerging Microbes & Infections*, v. 3, p. e32, 2014.
- [29] Cowen, L.E., et al., *Mechanisms of antifungal drug resistance*. Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2015. 5(7): p. a019752.
- [30] Nobre, M. D. O., Nascente, P. D. S., Meireles, M. C. A., & Ferreira, L. 2002. *Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais*. *Ciência rural*. Santa Maria. Vol. 32, p. 175-184.
- [31] Lacaz, C. D. S., & Del Negro, G. 1994. *Drogas antifúngicas: Terapêutica das micoses*. In *Farmacologia*. p. 1156-90.

- [32] Crawford, A. and D. Wilson, *Essential metals at the host–pathogen interface: nutritional immunity and micronutrient assimilation by human fungal pathogens*. FEMS yeast research, 2015. **15**(7).
- [33] Korukluoglu, M., Sahan, Y., Yigit, A., & Karakas, R. (2006). Antifungal activity of olive leaf (*Olea Europaea* L.) extracts from the Trilye region of Turkey. *Annals of microbiology*, 56(4), 359.
- [34] Odds, F. C.; Brown, A. J. P.; Gow, N. A. R. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiology*, 11 (6), 272-279, 2003.
- [35] Johann, S., Pizzolatti, M. G., Donnici, C. L., Resende, M. A. D. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 632-637. 2007.
- [36] 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.
- [37] 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.
- [38] Aly, F. M., Othman, A., & Haridy, M. A. 2018. *Protective Effects of Fullerene C60 Nanoparticles and Virgin Olive Oil against Genotoxicity Induced by Cyclophosphamide in Rats*. *Oxidative medicine and cellular longevity*.
- [39] Aree, T., & Jongrungruangchok, S. 2018. *Structure–antioxidant activity relationship of β -cyclodextrin inclusion complexes with olive tyrosol, hydroxytyrosol and oleuropein: Deep insights from X-ray analysis, DFT calculation and DPPH assay*. *Carbohydrate polymers*, 199, p. 661-669.
- [40] Romero, C.; Medina, E.; Vargas, J.; Brenes, M.; De Castro, A. *In Vitro Activity of Olive Oil Polyphenols against Helicobacter pylori*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 3, p. 680-686, 2007.
- [41] Upadhyay, R. K. *Evaluation of antibacterial and antifungal activities of olive (Olea europaea) essential oil*. *International Journal of Green Pharmacy*. v. 8, n. 3, p. 180- 186, 2014.
- [42] Markin, D., Duek, L., & Berdicevsky, I. (2003). In vitro antimicrobial activity of olive leaves. Antimikrobielle Wirksamkeit von Olivenblättern in vitro. *Mycoses*, 46(3-4), 132-136.
- [43] Lee, O. H., & Lee, B. Y. (2010). Antioxidant and antimicrobial activities of

individual and combined phenolics in *Olea europaea* leaf extract. *Bioresource technology*, 101(10), 3751-3754.

- [44] Pereira, A. P., Ferreira, I. C., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, P. B., Seabra, R. & Pereira, J. A. (2007). Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. *Molecules*, 12(5), 1153-1162.
- [45] Bisignano, G., Laganà, M. G., Trombetta, D., Arena, S., Nostro, A., Uccella, N., & Saija, A. (2001). In vitro antibacterial activity of some aliphatic aldehydes from *Olea europaea* L. *FEMS Microbiology Letters*, 198(1), 9-13.
- [46] Awwad, A. M., Salem, N. M., & Abdeen, A. O. (2012). Biosynthesis of silver nanoparticles using *Olea europaea* leaves extract and its antibacterial activity. *Nanoscience and Nanotechnology*, 2(6), 164-170.
- [47] Sudjana, A. N., D'Orazio, C., Ryan, V., Rasool, N., Ng, J., Islam, N., Hammer, K. A. (2009). Antimicrobial activity of commercial *Olea europaea* (olive) leaf extract. *International journal of antimicrobial agents*, 33(5), 461-463.
- [48] Furneri, P. M.; Marino, A.; Saija, A.; Uccella, N.; Bisignano, G. *In vitro antimycoplasmal activity of oleuropein*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. v. 20, n. 4, p. 293-296, 2002.
- [49] Bubonja-Sonje, M.; Giacometti, J.; Abram, M. *Antioxidant and antilisterial activity of olive oil, cocoa and Rosemary extract polyphenols*. *Journal Food Chemistry*. v. 127, p. 1821-1827, 2011.
- [50] 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.
- [51] Waller, S. B., Madrid, I. M., Silva, A. L., Castro, L. L. D, Cleff, M. B., Ferraz, V., Meireles, M. C. A., Zanette, R., Mello, J. R. B. M. *In Vitro Susceptibility of Sporothrix brasiliensis to Essential Oils of Lamiaceae Family*. *Mycopathologia*, v. 181, p. 857-863, 2016.
- [52] 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.
- [53] 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.

- [54] 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.

5. CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos permitem as seguintes conclusões:

- O extrato aquoso obtido por decocção durante dez minutos (DEC 10') foi efetivo frente a duas cepas padrões de *Candida albicans* e não mostrou efetividade frente a isolados clínicos de fungos do gênero *Candida* spp., dermatófitos e *Sporothrix* spp.
- Os extratos aquosos obtidos por infusão e decocção por dez minutos (INF 10' e DEC 10') do bagaço de azeitona foram de baixa citotoxicidade a partir da concentração de 50 mg/mL onde apresentaram de 15 a 50% de viabilidade celular.
- Os extratos aquosos de DEC 10' revelaram moderadas concentrações de oleuropeína e hidroxitirosol nas variedades testadas.
- Os extratos aquosos de INF 10' não revelaram presença de oleuropeína nas variedades arbequina, arbosana, frontoio e manzanilla, e baixas concentrações de hidroxitirosol em todas as variedades testadas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A cadeia produtiva da olivicultura no Rio Grande do Sul está organizada e conta com a Câmara Setorial e o fundo de desenvolvimento e hoje no estado contamos com 160 produtores que cultivam aproximadamente 4.800 hectares, extraem 50 mil litros de azeite, processado em doze indústrias que comercializam 26 diferentes marcas (Ibraoliva, 2019).

De acordo com os dados da IOC (*International Olive Oil Council*) o Brasil é o sexto maior consumidor e terceiro maior importador de azeite e está tornando-se um produtor em franca ascensão e com a perspectiva de chegar a um milhão de hectares de oliva nos próximos anos, com destaque de produção na região sul do Rio Grande do Sul.

Considerando a quantidade de resíduo produzido (bagaço e folha) pela indústria

processadora, surge a perspectiva de buscar nesses subprodutos um legado de insumos a agroindústria através da busca de compostos que possam agregar valor através da obtenção de extratos e óleos essenciais com atividades antimicrobianas. Na primeira fase da proposta foi trabalhado apenas o azeite e extrato aquoso com resultados discretos, uma vez que não trabalhou-se a parte foliar da oliveira, proposta para segunda fase, onde espera-se obter compostos com resultados promissores.

REFERÊNCIAS

- ALCAIDE, E.M.; GARCÍA, A.I.M.; RUIZ, D.R.Y. Los subproductos del olivaren la alimentación de ruminantes. **Informe Veterinario, Portal Veterinaria Albeitar**, n. 140, p. 32-34, 2010.
- 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 β -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.
- ARENAS GUZMÁN, R. Micología médica ilustrada. Ed. 4a. **McGraw Hill México**, 2013.
- AOC (Associação de Olivicultores de Caçapava do Sul – RS). **Variedades de Oliveira**. Disponível em: http://www.olivicultura-rs.com.br/variedades_registradas_mund.html. Acesso em: 06 dez. 2018.
- BARRANCO, D.; FERNANDEZ-ESCOBAR, R. RALLO, L. El cultivo del oilivo. 5 ed. **Madrid: Mundi-Prensa**, 800 p., 2004.
- BARROS, M. B. D. L., SCHUBACH, T. P., COLL, J. O., GREMIÃO, I. D., WANKE, B., SCHUBACH, A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. *Revista Panamericana de Salud Pública*, 27, 455-460, 2010.
- BENAVENTE-GARCIA, O., CASTILLO, J., LORENTE, J., ORTUNO, A., DEL RIO, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry** 68: 457–462, 2000.
- BRAUNWALD, E., FAUCI, A. S., KASPER, D. L., HAUSER, S. L., LONGO, D. L., JAMESON, J. L. (2002). Harrison: medicina interna, 15ª edição. In **Harrison: medicina interna**, 15ª edição, 2002.
- CABRERA, A.; FERNANDÉZ-HERNÁNDEZ, C.; CIVANTOS, C.G.; COX, L.; VELARDE, P.; CORNEJO, J. Estudio del efecto de la adición de alperujo sobre la persistência de diuron em el cultivo del olivar. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 33, n.1, p. 209-216, 2010.
- CARDOSO, M. J. L., MACHADO, L. H. A., MELUSSI, M., ZAMARIAN, T. P., CARNIELLI, C. M., JÚNIOR, J. C. M. F. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives of Veterinary Science**, 66-74, 2011.
- CLAUDINO, A. L. R., GRANJA, C. S., LIMA, A. R., PAULA, C. R., ALEVA, N. A., SILVA, R. B., CHAVASCO, J. K. Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Clotrimazol e da Terbinafina sobre isolados de *Candida albicans* oriundas da

mucosa bucal de pacientes HIV positivos e HIV negativos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, p. 95-104, 2012.

CLEFF, M.B.; SILVA, G.M.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.M.; MARTINS, A.A.; FONSECA, A.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. **Infecção cutânea em cão por *Candida albicans***. Revista Veterinária e Zootecnia, v. 2, n. 14, 2007.

COUTINHO, E.F.; RIBEIRO, F.C.; CAPPELLARO, T.H. Cultivo de oliveira (*Olea europaea* L.). **Embrapa Clima Temperado-Sistema de Produção (INFOTECA-E)**, 2009.

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.

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

CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte da literatura e considerações sobre o diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, 20, p. 08-28, 2011.

DUBUGRAS, M. T. B., LARSSON, C. E., LEDON, A. L. B. P., **Gambale, W.** Dermatofitoses e leveduras de cães e gatos. Aspectos diagnósticos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 273-287, 1992.

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.

FARIAS, M.R.; GIUFFRIDA, R. Antifungos. In: ANDRADE, S.F. Manual de Terapêutica Veterinária. São Paulo, Brasil. p. 59-70, 2002.

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.

GOMES, R.P. A olivicultura no Brasil. 2 ed. rev. São Paulo: Nobel, p 01-237, 1979.

GUILLOT, J. **Le diagnostic biologique des mycoses animales**. Revue Francaise des Laboratoires, n. 310, p. 57-64, 1999.

HEIT, M.C., & RIVIERE, J.E. (1995). Antifungal and antiviral drugs. **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Iowa State Univ. Press, Ames, Iowa, p. 855-883, 1995.

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.

IOOC (International Olive Oil Council). International trade standards applying to olive oil and olive residue oils. **COI/T. ISNC**. 2018.

IOOC (International Olive Oil Council). International trade standards applying to olive oil and olive residue oils. **COI/T. ISNC**. 2009.

JAHAM, C.; PARADES, M.; PAPICH, M.G. Traditional Antifungal Dermatologic Agents. **Compendium**, v. 22, p. 5, 2000.

JOHANN, S., PIZZOLATTI, M. G., DONNICI, C. L., RESENDE, M. A. D. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 632-637. 2007.

JUVEN, B., HENIS, Y. Studies on antimicrobial activity of olive phenolic compounds. **J. Appl. Bacteriol.**, 33: 721-732, 1970.

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.

KLEIN, T.; BASHIR, S.; KHAN, S.R.; GILANI, A.H. Antiurotic activity of *Origanum vulgare* is mediated through multiple pathways. **BCM Complementary Alternative Medicine**, v.11, 96, 2011.

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.

LACAZ, C.S.; PORTI, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Esporotricose e outras micoses gomosas. In: LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. Tratado de micologia médica. 9ªed. São Paulo: Sarvier. P. 479-497, 2002.

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

LARSSON, C. E., LEDON, A. L. B. P., CORRÊA, B., PAULA, C. R., FAVA NETTO, C. Dermatologia comparada-aspectos clínico laboratoriais de dermatites micóticas (*M. canis* e *S. schenkii*) de potencial zoonótico em São Paulo-Brasil. **Resumos**, 1988.

LARSSON, C.E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

MADRID, I.M., JÚNIOR, R.S., 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**, 35(1), 2007.

MADRID, I.M.; SANTIN, R.; SCHUCH, L.F.D.; GOMES, A.R.; et al. Morphological

patter and thermotolerance of clinical and from environment isolates of *Sporothrix schenckii* from the south of Brazil. **Rev. Bras. Ciênc. Vet.**, v. 18, n. 2/3, p. 57-61, 2011.

MARKIN, D., DUEK, L., BERDICEVSKY, I. In vitro antimicrobial activity of olive leaves. **Mycoses**, v. 46, n. 3-4, p. 132-136, 2003.

MEIRELES M.C.A. & NASCENTE P.S. Micologia Veterinária. Ed. Universitária UFPEL, Pelotas, p.456, 2009.

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.

MORE. **Marketing of olive residues for energy**. 2008. Disponível em: www.moreintelligentenergy.eu/public/file/downloads. Acesso em: 07 mar. 2018.

MORETTI, A.L.; BONCIO, B.; POSTERARO, L.; MECHELLI, M.; BALDUCCI. **Co-cutaneous infection in a dog: pcr-reverse identification of *C. tropicalis* on skin biopsy**. Journal Mycologi Medicine, v. 16, p. 30-36, 2006.

MORIELLO K.A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **Vet Dermatol**. 99–107, 2004.

MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V.; SHIPSTONE, M. **Cutaneous Candidiasis in a dog, caused by *Candida guilliermondii***. Veterinary Record, v. 150, p. 728-730, 2002.

MADRID, I. M., MATTEI, A., MARTINS, A., NOBRE, M., MEIRELES, M. Feline sporotrichosis in the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic aspects. **Zoonoses and Public Health**, 151-154, 2010.

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: mechanisms of action. **Trends in Microbiology**, 11 (6), 272-279, 2003.

PARRA, M.A., FERNÁNDEZ-ESCOBAR, R., NAVARRO, C., & ARQUERO, O. Los suelos y la fertilización del olivar cultivado en zonas calcáreas. **Mundi-Prensa, Madrid**, 2003.

PASTOR, M.; NAVARRO, C.; VEJA, V.; ARQUERO, O.; HERMOSO, M.; MORALES, J.; FERNANDÉZ, A.; RUIZ, F. Poda de formación de olivar. **VSevilla: Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía**, p. 24, 1995.

PEREIRA, A. P., FERREIRA, I. C. F. R., MARCELINO, F., VALENTÃO, P., ANDRADE, B. P., SEABRA, R., ESTEVINHO, L., BENTO, A., PEREIRA, J. A. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrançosa) leaves. **Molecules**, 12, 1153–1162, 2007.

QUINN P. J.; MARKEY B. K.; CARTER M. E.; DONNELLY W. J.; LEONARD F. C. *Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas*. 1st edn. **Artmed, Porto Alegre**, p. 219-245, 2005.

QUINN P.J.; MARKEY B.K.; LEONARD F.C.; HARTIGAN P.; FANNING S.; FITZPATRICK E.S. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. 2nd ed. Wiley-Blackwell, Ames, Iowa. p. 928, 2011.

RAPOSO, J.B., NOBRE, M.O., FERNANDES, C.G., PORTO, M. **Candidíase cutânea em um canino**. Revista da FZVA, 1996.

RIPPON, J.N. **The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes**. In: *Medical Mycology*, Saunders, 797p. 1998.

SIDRIM, J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 287p., 1999.

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

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUN, F. *Microbiologia*. 4. ed.. **São Paulo: Atheneu**, p. 487-499 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. *Drogas Antimicrobianas*. **Microbiologia, ed. Artmed. Porto Alegre**, 531-553, 2000

VARGAS, B., PARCHA, C., REYES ARENAS, E. Antifúngicos de uso clínico, análisis de un laboratorio de micología. **Cienc. Trab**, 7(15), 9-16, 2005

VILLA, P. **El cultivo del olivo**. De Vecchi, 2004.

WALLER, S.B.; MADRID, I.M.; FERRAZ, V.; PICOLI, T.; 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, n. 4, p. 896-901, 2016.

WILLEMSE, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos**. São Paulo: Manole. p. 21, 1994.

WILLEMSE, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos: guia para o diagnóstico e terapêutica**. Manole, 2002.

ZIARRUSTA, G.B. **Vulvovaginitis candidiasica**. Revista Iberoamericana de Micologia. V. 19, p. 22-24, 2002.

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.

ANEXOS

ANEXOS I – Resumo expandido publicado na terceira semana integrada da Universidade Federal de Pelotas 2017, categoria XIX Encontro de Pós-Graduação.



ENPOS XIX ENCONTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

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

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 (UFPEL) – annavet@live.com

³Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – emanoele_serra@gmail.com

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

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

⁶Universidade Federal de Pelotas (UFPEL) – 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., 2008).

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 *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidemophyton*, 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 *Microsporum* 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 *Microsporum canis*, um *Microsporum nanum* e um *Microsporum 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 líquido 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 sequência adicionou-se 100 µl de inóculo diluído em sabouraud líquido 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 *Microsporum* 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. *Aspectos 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: mechanisms 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.