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

POTENCIAL ANTI-*Sporothrix* spp. DE PLANTAS DA FAMÍLIA LAMIACEAE

STEFANIE BRESSAN WALLER

PORTO ALEGRE
2015

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

POTENCIAL ANTI-*Sporothrix* spp. DE PLANTAS DA FAMÍLIA LAMIACEAE

Autor: Stefanie Bressan Waller

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Veterinárias na área de Morfologia, Cirurgia e Patologia Animal e na especialidade de Farmacologia e Terapêutica.

Orientador: João Roberto Braga de Mello
Co-orientadora: Marlete Brum Cleff

PORTO ALEGRE
2015

CIP - Catalogação na Publicação

Waller, Stefanie Bressan
Potencial anti-Sporothrix spp. de plantas da família Lamiaceae / Stefanie Bressan Waller. -- 2015.
127 f.

Orientador: João Roberto Braga de Mello.
Coorientadora: Marlete Brum Cleff.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre, BR-RS, 2015.

1. Origanum vulgare L.. 2. Origanum majorana L.. 3. Rosmarinus officinalis L.. 4. esporotricose. 5. resistência antifúngica. I. de Mello, João Roberto Braga, orient. II. Cleff, Marlete Brum, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Stefanie Bressan Waller

POTENCIAL ANTI-*Sporothrix* spp. DE PLANTAS DA FAMÍLIA LAMIACEAE

Aprovada em 26 FEV 2015

APROVADO POR:

_____

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

_____

Prof. Drª. Fernanda Bastos de Mello
Membro da Comissão

_____

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles
Membro da Comissão

_____

Prof. Drª. Renata Osório de Faria
Membro da Comissão

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelos aprendizados durante a vida, pela saúde e pela oportunidade em conhecer pessoas essenciais, que direta ou indiretamente auxiliaram na realização deste trabalho.

Aos meus pais, Dalcir e Suzana, e à minha irmã, Dalciana, pelos ensinamentos sobre vida, amizade e apoio nos momentos necessários.

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Roberto Braga de Mello, pelos ensinamentos, oportunidades e confiança dedicados a mim. À minha co-orientadora, Profª Drª Marlete Brum Cleff, pela confiança, amizade e ensinamentos.

Aos amigos, colegas e professores, em especial à Dra. Isabel Martins Madrid, pelos ensinamentos, amizade e oportunidades. Agradeço à equipe do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MicVet - UFPEL), especialmente ao Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles e à Prof. Drª Renata Osório de Faria, assim como às pós-graduandas Angelita, Alessandra, Ângela, Josiara e Otávia e aos bolsistas e estagiários, em especial à Anna Luiza, Gisele e Camila, pelos auxílios laboratoriais. Agradeço também às pós-graduandas e estagiárias do grupo de Pesquisa, Ensino e Extensão em Produtos Naturais na Clínica Médica Veterinária (Fitopeet) pelo apoio.

À CAPES pela bolsa de estudos e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRGS.

RESUMO

POTENCIAL ANTI-*Sporothrix* spp. DE PLANTAS DA FAMÍLIA LAMIACEAE

Autor: Stefanie Bressan Waller

Orientador: João Roberto Braga de Mello

Co-orientadora: Marlete Brum Cleff

As propriedades terapêuticas das plantas medicinais são cada vez mais estudadas, principalmente devido aos crescentes casos de resistência antimicrobiana, como observado em cepas do Complexo *Sporothrix*. As plantas da família Lamiaceae são conhecidas por suas propriedades antifúngicas, entretanto, são escassos seus estudos contra agentes causadores da esporotricose. Devido ao potencial promissor dessas plantas, objetivou-se (1) avaliar a atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* de *Origanum vulgare* L. (orégano), *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) nas formas de óleos essenciais, extratos aquosos de infusão e decocção e extratos hidroalcoólicos contra isolados clínicos de *Sporothrix* spp. obtidos de casos clínicos de esporotricose humana, canina e felina; (2) avaliar os principais constituintes químicos presentes nos óleos essenciais das plantas; e (3) avaliar a atividade citotóxica *in vitro*. Extratos aquosos e hidroalcoólicos foram preparados a partir de partes aéreas das plantas. Em óleos essenciais, produtos comerciais e produtos extraídos de partes aéreas por hidrodestilação em Clevenger foram testados. Ambos óleos foram analisados quimicamente por cromatografia gasosa. Testes *in vitro* foram realizados pela técnica de Microdiluição em Caldo contra isolados clínicos de *Sporothrix* spp. oriundos de humanos, caninos e felinos, bem como ambiental nas fases leveduriforme (CLSI-M27A3) e filamentosa (CLSI-M38A2), sendo testados entre 72 a 0.07 mg/mL. Os efeitos citotóxicos foram avaliados através do ensaio MTT em células VERO (78 a 5000 μg/mL). Na fase leveduriforme, os óleos essenciais extraído e comercial de orégano apresentaram atividade anti-*Sporothrix* spp. nas concentrações inibitórias mínimas (CIM) e concentrações fungicidas mínimas (CFM) de 36 a ≤2.25 mg/mL e de alecrim entre 72 a≤2.25 mg/mL, não havendo diferença estatística entre os tipos de óleos. Por sua vez, óleo comercial de manjerona apresentou CIM/CFM de 18 a ≤2.25 mg/mL. Na fase micelial, 100% dos isolados felinos e caninos foram sensíveis aos óleos essenciais de orégano (0.14 a ≤0.07 mg/mL), alecrim (18 a ≤0,07 mg/mL) e manjerona (4.5 a ≤0.07 mg/mL). Extratos aquosos e hidroalcoólicos de orégano apresentaram atividade inibitória e fungicida, respectivamente, em 100% e entre 90% a 35% dos isolados animais (40 a ≤0.07 mg/mL). Nas mesmas concentrações, o extrato hidroalcoólico de manjerona inibiu de 90% a 100% dos isolados. Entretanto, os demais extratos de manjerona e de alecrim apresentaram fraca atividade anti-*Sporothrix* spp. sobre 40% a 5% dos isolados, não havendo atividade antifúngica sobre as infusões de alecrim preparadas em 10 e 60 minutos. Sobre itraconazol, *Sporothrix* spp. foi sensível na fase leveduriforme (16 a ≤0.03 μg/mL) e filamentosa (64 a ≤0.12 μg/mL), entretanto,

foi observada resistência antifúngica em 4% e 28% (CIM e CFM >16 μg/mL, respectivamente) dos isolados na fase leveduriforme, ao passo que, na fase filamentosa, a resistência ocorreu em 12,5% e 85% dos isolados (CIM e CFM >64 μg/mL, respectivamente). Os óleos essenciais de orégano e manjerona apresentaram maior atividade citotóxica com 80% de inviabilidade celular, ao passo que os extratos aquosos e hidroalcoólico de manjerona foram os menos citotóxicos. A análise química foi similar nos produtos das plantas Lamiaceae, diferindo a concentração dos compostos, os quais α-pineno e 1,8-cineol foram majoritários para o óleo extraído do alecrim e α-terpineno, terpineol-4 e timol para o óleo extraído de orégano, ao passo que 1,8-cineol foi majoritário para os produtos comerciais de alecrim e manjerona, e carvacrol para orégano. A boa atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* das plantas da família Lamiaceae, em especial ao *Origanum vulgare* L., é promissora para o tratamento da esporotricose, inclusive sobre isolados clínicos resistentes.

Palavras-chave: *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Origanum majorana* L., esporotricose, resistência antifúngica.

ABSTRACT

ANTI-*Sporothrix* spp. POTENTIAL OF THE LAMIACEAE PLANTS

Therapeutics properties of medicinal plants are increasingly studied, mainly due to increasing cases of antimicrobial cases, as observed in strains of *Sporothrix* Complex. Plants of Lamiaceae family are known for their antifungal properties, but studies in causative agents of sporotrichosis are scarces. Due to the promising potential of these plants, aimed to (1) evaluate the *in vitro* anti-*Sporothrix* spp. activity of aqueous extracts of infusion and decoction, hydroalcoholic extract and essential oils os *Origanum vulgare* L. (oregano), *Origanum majorana* L. (marjoram) and *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary); (2) evaluate the main chemical constituents present in essential oils; and (3) evaluate the *in vitro* cytotoxic activity. Aqueous and hydroalcoholic extracts were prepared from the aerial parts of the plants. In essential oils, commercial products and extracted products from aerial parts through hydrodistillation in Clevenger were tested. Both essential oils were chemically analyzed by gas chromatography. *In vitro* tests were performed by broth microdilution technique against clinical isolates of *Sporothrix* spp. from humans, dogs and cats with sporotrichosis, as well as environmental soil, in yeast (CLSI-M27A3) and mycelial (CLSI-M38A2) phases and tested from 72 to 0.07 mg/mL. Cytotoxic effects were assessed by MTT assay on VERO cells (78 to 5000 μg/mL). In yeast phase, the extracted and commercial essential oils of oregano showed anti-*Sporothrix* spp. activity in the minimum inhibitory concentrations (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of 36 to ≤2.25 mg/mL and rosemary between 72 to ≤2.25 mg/mL, with no statistical difference between the types of oils. In turn, commercial marjoram oil showed MIC/MFC of ≤2.25 to 18 mg/mL. In the mycelial phase, 100% of feline and canine isolates were sensibles to essential oils of oregano (0.14 to ≤0.07 mg/mL), rosemary (18 to ≤0,07 mg/mL) and marjoram (4.5 to ≤0.07 mg/ml). Aqueous and hydroalcoholic extracts of oregano showed inhibitory and fungicidal activity, respectively, 100% and between 90% and 35% of animal isolates (40 to ≤0.07 mg/mL). In the same concentrations, hydroalcoholic extract of marjoram inhibited 90% to 100% of the isolates. However, other extracts of marjoram and rosemary showed weak activity anti-*Sporothrix* spp. about 40% to 5% of the isolates, with no antifungal activity by INF_{10} and INF_{60} rosemary. About itraconazole, *Sporothrix* spp. was sensitive in the yeast phase (16 to ≤0.03 mg/mL) and filamentous (64 to ≤0.12 mg/mL), however, antifungal resistance was observed in 4% and 28% (MIC and MFC > 16 μg/mL, respectively) in fungal isolates in the yeast form, and in the mycelial form, the resistence occurred in 12.5% and 85% of isolates (MIC and MFC > 64 μg/mL, respectively). Essential oils of oregano and marjoram exhibited greater cytotoxic activity with 80% cell inviability, while hydroalcoholic and aqueous extracts of marjoram were less cytotoxic. The chemical analysis was similar for the products of Lamiaceae plants and differed in the concentration of the compounds, which α-pinene and 1,8-cineole were majoritary for extracted oil of rosemary and α-terpinene, terpineol-4 and thymol for extracted oil of

oregano, while 1,8-cineole was majoritary for commercial products of rosemaru and marjoram, and carvacrol for oregano. The good *in vitro* anti-*Sporothrix* spp. activity of the plants of Lamiaceae family, mainly to *Origanum vulgare* L., is promising for the treatment of sporotrichosis, including against clinical isolates resistant.

Keywords: *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L., *Origanum majorana* L., sporotrichosis, antifungal resistance.

LISTA DE FIGURAS

ARTIGO 1. "Eficácia de Óleos Essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. de diferentes origens frente ao Complexo *Sporothrix*"

Figura 1 – Constituintes identificados no óleo essencial extraído de partes aéreas de *Origanum vulgare* L. por cromatografia gasosa (CG-FID): α-pineno (1), canfeno (2), β-pineno (3), mirceno (4), α-terpineno (5), p-cimeno (6), limoneno (7), 1,8-cineol (8), terpinoleno (9), linalool (10), terpinen-4-ol (11), α-terpineol (12), timol (13) e carvacrol (14)..... 42

Figura 2 – Constituintes identificados no óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* L. por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID): α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-felandreno, α-terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, γ-terpineno, linalool, cânfora, terpinen-4-ol, α-terpineol, timol, carvacrol, β-cariofileno, humuleno e outros constituintes..... 43

Figura 3 – Constituintes identificados no óleo essencial extraído de partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografia gasosa (CG-FID): α-pineno (1), canfeno (2), β-pineno (3), mirceno (4), α-terpineno (5), p-cimeno (6), limoneno (7), 1,8-cineol (8), terpinoleno (9), linalool (10), terpinen-4-ol (11), α-terpineol (12)..... 44

Figura 4 – Constituintes identificados no óleo essencial comercial de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID): α-thujeno, α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-felandreno, α-terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, γ-terpineno, linalool, cânfora, terpinen-4-ol, α-terpineol, acetato de bornila, α-copaeno, β-cariofileno, humuleno e outros constituintes..... 44

ARTIGO 2. "Sensibilidade de Fungos do Complexo *Sporothrix* à Manjerona (*Origanum majorana* L.)"

Figura 1 – Percentual de citotoxicidade (%) em células VERO testadas em ensaio MTT sobre o óleo essencial de *Origanum majorana* L. nas concentrações de 0.078 a 5 mg/mL..... 59

Figura 2 – Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Origanum majorana* L. através da cromatografia gasosa de alta resolução por tempo de retenção em minutos (CG-FID).... 60

ARTIGO 3. "Atividade Anti-*Sporothrix* spp. de Óleos Essenciais Comerciais de Plantas da Família Lamiaceae"

Figura 1 – Constituintes identificados no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografia gasosa (CG-FID): α-thujeno (0.2%), α-pineno (12.2%), canfeno (1.1%), β-pineno (9.4%), mirceno (0.5%), α-felandreno (0.1%), α-terpineno (0.1%), p-cimeno (0.4%), limoneno (2.0%), 1,8-cineol (49.4%), γ-terpineno (0.1%), linalool (1.0%), cânfora (17.8%), terpinen-4-ol (0.2%), α-terpineol (0.5%), acetato de bornila (0.3%), α-copaeno (0.3%), β-cariofileno (3.7%), humuleno (0.2%) e outros constituintes (0.4%)..... 76

Figura 2 – Constituintes identificados no óleo essencial de *Origanum vulgare* L. por cromatografia gasosa (CG-FID): α-pineno (0.4%), canfeno (0.2%), β-pineno (0.9%), mirceno (0.4%), α-felandreno (0.1%), α-terpineno (0.6%), p-cimeno (2.5%), limoneno (0.7%), 1,8-cineol (1.1%), γ-terpineno (3.6%), linalool (2.1%), cânfora (0.8%), terpinen-4-ol (0.7%), α-terpineol (0.8%), timol (3.0%), carvacrol (73.9%), β-cariofileno (2.8%), humuleno (0.9%) e outros (4.5%)..... 77

Figura 3 – Constituintes identificados no óleo essencial de *Origanum majorana* L. por cromatografia gasosa (CG-FID): α-thujeno (1.1%), α-pineno (2.0%), canfeno (0.4%), sabineno (6.7%), β-pineno (1.9%), mirceno (1.6%), α-felandreno (0.9%), α-terpineno (4.6%), p-cimeno (7.0%), limoneno (5.3%), 1,8-cineol (20.9%), β-ocimeno (0.1%), γ-terpineno (8.5%), trans-hidrato sabineno (2.3%), linalool (4.4%), cânfora (0.2%), terpinen-4-ol (20.4%), α-terpineol (4.7%), acetato de linalila (1.8%), acetato de bornila (0.8%), β-cariofileno (2.2%), humuleno (0.2%) e outros constituintes (2.1%)..... 78

Figura 4 – Percentual de toxicidade celular *in vitro* dos óleos essenciais comerciais de plantas selecionadas da família Lamiaceae – *Rosmarinus officinalis* L., *Origanum majorana* L. e *Origanum vulgare* L. – após incubação por 48 horas..... 79

ARTIGO 4. "Extratos de Plantas Selecionadas da Família Lamiaceae contra Fungos do Complexo *Sporothrix*"

Figura 1 – Toxicidade celular (%) *in vitro* de extratos aquosos de infusão a 10 (INF10) e 60 (INF60) minutos, decocção (DEC) e extrato hidroalcoólico (EHA) de *Origanum vulgare* L..... 96

Figura 2 – Toxicidade celular (%) *in vitro* de extratos aquosos de infusão a 10 (INF10) e 60 (INF60) minutos, decocção (DEC) e extrato hidroalcoólico (EHA) de *Origanum majorana* L..... 97

Figura 3 – Toxicidade celular (%) *in vitro* de extratos aquosos de infusão a 10 (INF10) e 60 (INF60) minutos, decocção (DEC) e extrato hidroalcoólico (EHA) de *Rosmarinus officinalis* L..... 98

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1. "Eficácia de Óleos Essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. de diferentes origens frente ao Complexo *Sporothrix*"

Tabela 1 – Atividade antifúngica de óleos essenciais extraídos e comerciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. contra fungos do Complexo *Sporothrix*..... 39

ARTIGO 2. "Sensibilidade de Fungos do Complexo *Sporothrix* à Manjerona (*Origanum majorana* L.)"

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *Origanum majorana* L. e do itraconazol sobre isolados clínicos do Complexo *Sporothrix*..... 57
Tabela 2 – Constituintes químicos encontrados no óleo essencial de *Origanum majorana* L..... 61

ARTIGO 3. "Atividade Anti-*Sporothrix* spp. de Óleos Essenciais Comerciais de Plantas da Família Lamiaceae"

Tabela 1 – Atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum majorana* L. contra fungos do Complexo *Sporothrix* isolados de felinos e caninos com esporotricose……..... 73

ARTIGO 4. "Extratos de Plantas Selecionadas da Família Lamiaceae contra Fungos do Complexo *Sporothrix*"

Tabela 1 – Toxicidade celular (%) à 5 mg/mL dos extratos de *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L..... 98
Tabela 2 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de extratos aquosos e hidroalcoólicos de plantas selecionadas da família Lamiaceae – *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L. contra isolados clínicos do Complexo *Sporothrix* de oriundos de caninos e felinos..... 100

SUMÁRIO

1	**INTRODUÇÃO**	12
2	**OBJETIVOS**	14
2.1	**Objetivos Geral**	14
2.2	**Objetivos Específicos**	14
3	**REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**	15
3.1	**Esporotricose**	15
3.2	**Abordagem Terapêutica Convencional da Esporotricose**	19
3.3	**Plantas com Atividade Anti-*Sporothrix* spp.**	23
3.4	**Plantas da Família Lamiaceae**	24
4	**ARTIGOS CIENTÍFICOS**	30
4.1	ARTIGO 1 – Eficácia de Óleos Essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. de diferentes origens frente ao Complexo *Sporothrix*	31
4.2	ARTIGO 2 – Sensibilidade de Fungos do Complexo *Sporothrix* à Manjerona (*Origanum majorana* L.)	51
4.3	ARTIGO 3 – Atividade Anti-*Sporothrix* spp. de Óleos Essenciais Comerciais de Plantas da Família Lamiaceae	66
4.4	ARTIGO 4 – Extratos de Plantas Selecionadas da Família Lamiaceae contra Fungos do Complexo *Sporothrix*	87
5	**CONCLUSÕES**	113
6	**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**	114

1 INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma infecção fúngica severa causada por fungos do Complexo *Sporothrix* (MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007). A enfermidade é de ocorrência mundial e acomete humanos e animais, como caninos e, principalmente, felinos, apresentando elevado potencial zoonótico (SCHUBACH et al., 2004; MADRID et al., 2007; CRUZ, 2011; LARSSON, 2011). Esta micose é frequente nas regiões de zonas tropical e subtropical, sendo endêmica nas Américas Central e do Sul e África (RAMOS; SILVA et al., 2007), e nas regiões Sudeste e Sul do Brasil (OTSUKA et al., 2004; SCHUBACH et al., 2004; MADRID et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014).

A micose é caracterizada por lesões nodulares subcutâneas com envolvimento ou não do sistema linfático, cuja infecção pode ocorrer através da inoculação traumática cutânea por conídios fúngicos do Complexo *Sporothrix* presentes em fontes ambientais contaminadas (KAUFFMAN et al., 2007), ou ainda por transmissão zoonótica através de arranhaduras ou mordeduras de felinos infectados ou assintomáticos (MADRID et al., 2010; CRUZ, 2011; RODRIGUES et al., 2013). Diversos protocolos terapêuticos são preconizados em medicina veterinária, sendo o uso do antifúngico itraconazol considerado de eleição para o tratamento da esporotricose felina e canina (MADRID et al., 2010; PEREIRA et al., 2010; ROSSI et al., 2013). Entretanto, o surgimento de cepas resistentes de *Sporothrix* spp. tem dificultado a resolução da micose (MARIMON et al., 2008; RODRIGUES et al., 2014).

Diante da problemática de resistência antimicrobiana, há uma necessidade contínua e urgente em descobrir novos compostos antimicrobianos e compreender seu mecanismo de ação (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). Nesse sentido, têm-se buscado alternativas terapêuticas que visem auxiliar na terapia contra a esporotricose, tendo nas plantas uma fonte promissora para o seu tratamento (JOHANN et al., 2007; DAMIÁN-BADILLO et al., 2008; FATIMA et al., 2009; MÁRQUEZ, 2010), as quais devem seguir os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade adotados pelos medicamentos aloterápicos (KLEIN et al., 2009). O uso de plantas para fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade e, de acordo com dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 60% da população dos países

em desenvolvimento dependem de plantas medicinais como forma única de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA Jr. et al., 2005).

Dentre as plantas com propriedades medicinais estudadas, estão aquelas pertencentes à família Lamiaceae, ricamente utilizadas como condimento culinário e em aplicações em indústria cosmética e alimentícia, devido ao potencial anti-oxidante (LAMBERT et al., 2001; BAYDAR et al., 2004; LUQMAN et al., 2007). Na medicina popular, são utilizadas no tratamento de diversas enfermidades, sendo a infusão do orégano (*Origanum vulgare* L.) recomendado em inflamações e infecções cutâneas para uso tópico, assim como a infusão da manjerona (*Origanum majorana* L.), conhecida pela ação antiinflamatória, e a infusão de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) com potencial cicatrizante e antimicrobiano no uso interno e externo (LAMBERT et al., 2001; GIORDANI et al., 2012). Dentre os diversos constituintes químicos presentes nestas plantas, os terpenos são considerados os principais componentes com ação antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001). Essas espécies botânicas estão sendo cada vez mais exploradas cientificamente, por suas propriedades antimicrobianas atribuídas contra diversos microorganismos, inclusive contra fungos patogênicos (MANOHAR et al., 2001; CHAMI et al., 2004; LUQMAN et al., 2007; CLEFF et al., 2008; PACKER; LUZ, 2009; SAEED; TARIQ, 2009; CLEFF et al., 2010; GALUPPI et al., 2010; SOUZA et al., 2010).

Na esporotricose, estudos *in vitro* com óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (CLEFF et al., 2008) e *Rosmarinus officinalis* L. (LUQMAN et al., 2007) já demonstraram a atividade anti-*Sporothrix* spp., entretanto, as pesquisas ainda são escassas e estudos demonstrando atividade do *Origanum majorana* L. contra *Sporothrix* spp. não foram encontrados na literatura consultada. Diante do potencial das plantas da família Lamiaceae e da urgente necessidade em detectar novas fontes terapêuticas promissoras, salienta-se a importância em investigar estes recursos na esporotricose humana e animal.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade de *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L. contra fungos do Complexo *Sporothrix* spp.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a atividade fungistática e fungicida *in vitro* de *Origanum vulgare* L. (orégano), *Origanum majorana* L. (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) nas formas de óleos essenciais, extratos aquosos de infusão preparadas em 10 e 60 minutos, decocção e extratos hidroalcoólicos contra isolados clínicos de *Sporothrix* spp. obtidos de casos clínicos de esporotricose humana, canina e felina, e isolado ambiental;
- Avaliar a atividade fungistática e fungicida *in vitro* do itraconazol contra isolados clínicos de *Sporothrix* spp. obtidos de casos de esporotricose humana, canina e felina, e isolado ambiental;
- Comparar a suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *Sporothrix* spp. de humanos, caninos e felinos aos diferentes extratos das plantas e ao itraconazol;
- Pesquisar e comparar a atividade citotóxica *in vitro* de *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L. nas formas de óleos essenciais, extratos aquosos e extratos hidroalcoólicos em células VERO;
- Analisar os constituintes químicos dos produtos naturais que apresentarem melhor atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Esporotricose

A esporotricose é uma micose subcutânea que afeta o homem e várias espécies animais, sendo causada por espécies fúngicas pertencentes ao Complexo *Sporothrix* (MARIMON et al., 2007). *Sporothrix schenckii* era conhecido como a única espécie patogênica do gênero *Sporothrix* spp., entretanto, estudos recentes a partir de análises de sequência molecular demonstraram que o agente da esporotricose pertenceria a um Complexo, contendo várias espécies patogênicas no gênero, como *S. brasiliensis*, *S. schenckii* sensu stricto, *S. globosa*, *S. luriei*, *S. mexicana* e *S. albicans*, os quais são abrangidos no chamado Complexo *Sporothrix* (MARIMON et al., 2006; MARIMON et al., 2007; RODRIGUES et al., 2014). No Brasil, *S. brasiliensis* é relatado com alta prevalência nos casos de surtos de esporotricose felina, sendo considerado a espécie mais patogênica dentre as demais espécies do Complexo *Sporothrix* (RODRIGUES et al., 2013), e, em adição, estudos concluíram que a suscetibilidade antifúngica parece ser dependente das cepas testadas (TRILLES, 2005), o que pode explicar a resistência em muitos casos clínicos.

De potencial zoonótico, esta micose é considerada uma doença emergente e reconhecida mundialmente (MADRID et al., 2011a), principalmente nas regiões de clima tropical e subtropical, sendo observada em diversos países da África, Europa, Ásia, América Central e América do Sul (LACAZ et al., 2002, SILVA et al., 2012). A esporotricose é uma das principais infecções fúngicas em saúde pública no Brasil, com tendência ao crescimento exponencial do número de casos em animais e humanos (BARROS et al., 2010), cujos relatos esporádicos têm ocorrência nos estados de Mato Grosso, Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Santa Catarina (CARVALHO et al., 2002; ALMEIDA et al., 2009; COLODEL et al., 2009; ALVES et al., 2010), sendo que, no Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, a esporotricose apresenta frequentes casos em humanos e animais, sendo considerada um problema endêmico de saúde pública (BARROS et al., 2001; SCHUBACH et al., 2004; MADRID et al., 2010).

Sporothrix spp. é um fungo sapróbio de solos ricos em matéria orgânica e em ambientes vegetais, como cascas de árvores, plantas e matérias em decomposição (LACAZ et al., 2002). Assim, o contato físico direto com envolvimento traumático da pele por materiais perfuro-cortantes, contendo os conídios, corresponde a transmissão mais comum da doença no mundo (CRUZ, 2011). Antigamente, no Brasil, a esporotricose era considerada ocupacional por estar estreitamente relacionada àqueles pacientes que apresentavam contato íntimo com material vegetal, como agricultores, jardineiros, trabalhadores rurais e em exploração madeireira, entre outros (LACAZ et al., 2002), os quais representam o grupo de risco para a doença, ocorrendo atualmente casos esporádicos ou pequenos surtos no Brasil (LOPES-BEZERRA et al., 2006; CRUZ, 2011).

Entretanto, nas regiões endêmicas do Brasil, como Rio de Janeiro e Rio Grande do Sul, a principal transmissão da esporotricose se dá com envolvimento zoonótico através da arranhadura e/ou mordidas de felinos infectados (XAVIER et al., 2004; BARROS et al., 2010; CRUZ, 2011), sendo esta espécie animal atribuída ao maior número de casos registrados de esporotricose e considerada a principal transmissora inter e intra-espécie da esporotricose (MADRID et al., 2011).

Felinos sadios também podem carrear os conídios de *Sporothrix* spp. em suas unhas, através do seu contato direto com o ambiente ao afiar as unhas em troncos de árvores e cavar o solo. Além disso, o hábito de higiene corporal por meio de lambedura facilita a transmissão do fungo presente nas garras ou, em casos de felinos doentes, nas suas lesões clínicas para a cavidade oral, podendo transmitir a doença para humanos e outros animais através da mordedura em brigas ou brincadeiras que envolvem traumas cutâneos (MONTEIRO et al., 2008; CRUZ, 2011; LARSSON, 2011).

Em regiões endêmicas, o principal grupo de risco para a esporotricose constitui os proprietários de felinos e médicos veterinários (MONTEIRO et al., 2008; SILVA et al., 2012), principalmente quando em contato com felinos machos não-castrados, em idade reprodutiva e peridomiciliados, por se envolverem frequentemente em disputas territoriais e reprodutivas por fêmeas (GENARO, 2005). Embora a esporotricose ocorra principalmente em humanos, felinos e caninos, Cruz (2011) afirma que outros animais já foram relatados com a doença, como tatus, golfinhos, equinos, bovinos, roedores, lagomorfos, raposas, entre outros.

Com característica dimórfica, os fungos do Complexo *Sporothrix* apresentam-se sobre forma filamentosa no ambiente e sobre forma leveduriforme em parasitismo humano e animal, sendo que ambas apresentações morfológicas também ocorrem em cultivos laboratoriais às temperatutas de 25ºC e 37ºC, respectivamente (LACAZ et al., 2002; MEIRELES & NASCENTE, 2009; CRUZ, 2011). Assim, a infecção ocorre através da inoculação traumática dos conídios de *Sporothrix* spp. em ambas formas morfológicas, desencadeando a doença em caráter crônico ou subagudo, dependendo do estado imunitário do hospedeiro (DE ARAÚJO, 2001; CRUZ, 2011; LARSSON 2011). Na inoculação traumática a partir de fontes ambientais contendo os conídios de *Sporothrix* spp., como farpas de madeira, solo, espinhos, etc., a infecção ocorre pelo fungo na fase filamentosa, ao passo que a fase leveduriforme em parasitismo é transmitida através da arranhadura e mordedura de felinos infectados (KAUFFMAN et al., 2007; MEIRELES & NASCENTE, 2009; CRUZ, 2011; MADRID et al., 2010; LARSSON, 2011). Na infecção pela fase filamentosa, entre 24 a 48 horas após a inoculação ocorre o desaparecimento das hifas fúngicas, e a transição desta para a fase leveduriforme em aproximadamente 13 dias. Assim, o período de incubação da esporotricose por infecção pela fase filamentosa é maior, e varia de uma semana a um mês, ao passo que na infecção por células leveduriformes, a multiplicação celular é imediata por não haver a necessidade de transição morfológica (MEIRELES & NASCENTE, 2009; CRUZ, 2011).

A imunidade do hospedeiro pode contribuir para a permanência localizada da lesão no ponto inoculado até a involução espontânea, remanescendo a "cicatriz imunológica", configurada em humanos através de provas intradérmicas positivas à proteína esporotriquina (LARSSON 2011). Entretanto, os fatores de patogenicidade dificultam a eficiência do sistema imunológico em combater o agente, tais como termotolerância, presença de melanina, enzimas extracelulares e constituintes da parede celular (MADRID et al., 2007; SILVA, 2010), os quais facilitam a instalação da infecção e desenvolvimento de lesões clínicas. A enfermidade apresenta tempo de evolução variada de 2 a 24 meses (MADRID et al., 2010), cujas apresentações clínicas ocorrem nas formas cutânea e cutânea-linfática, e mais raramente na forma sistêmica, ocorrendo esta nos casos de imunossupressão do hospedeiro através da disseminação linfática, hematógena ou pela auto-inoculação (LACAZ et al., 2002).

As lesões cutâneas no hospedeiro surgem no ponto de inoculação, as quais são manifestadas por nódulos que tendem a ulcerar, liberando secreção, principalmente na cabeça, face, tronco, extremidades dos membros e cauda, podendo envolver o sistema linfático (DE ARAÚJO, 2001; ROSSER & DUNSTAN, 2006; CRUZ, 2011; LARSSON 2011; MADRID et al., 2011). Embora ocasional e esporádica, a infecção por inalação dos conídios fúngicos pode ocorrer, desenvolvendo esporotricose pulmonar (DA ROSA et al., 2005; MONTEIRO et al., 2008), cujos sinais respiratórios se manifestam principalmente por dispnéia, secreção nasal e espirros, principalmente nos casos de inoculação traumática fúngica no plano nasal, associada com edemas alveolares (SCHUBACH 2004; BORGES, 2007; MADRID et al., 2011). Em casos graves, as lesões podem evoluir para necrose com exposição de músculos e até ossos, principalmente em felinos (SCOTT, 1996).

Nos felinos, a forma cutânea-linfática é observada através de múltiplas lesões nodulares nos tecidos cutâneo e subcutâneo, com úlceras contendo material exsudativo drenante. Áreas de necrose podem ser observadas, devido à característica dos felinos de apresentarem elevado número de células leveduriformes de *Sporothrix* spp. em suas lesões clínicas, característica esta que torna esta espécie um potencial zoonótico com alto risco de transmissão da doença (MONTEIRO et al., 2008; LARSSON, 2011; MADRID et al., 2011). Nos caninos, o plano nasal é frequentemente afetado, o que pode ser explicada pela área ser primeiramente atingida em brigas com felinos através de arranhaduras (LARSSON, 2011). As lesões nodulares tendem a ser firmes, ulceradas e com presença de exsudato purulento, evoluindo para crostas, e geralmente com ausência de prurido (CRUZ, 2011).

No diagnóstico de certeza da esporotricose, é preciso associar o histórico do animal, a anamnese, sinais clínicos e isolamento de *Sporothrix* spp. em meios de culturas a partir da coleta de material clínico no animal suspeito, utilizando-se *swabs* estéreis e raspado com lâmina estéril de bisturi, sendo que nos casos em que estes métodos não permitirem o crescimento fúngico, uma biópsia cutânea ou punção aspirativa por agulha fina podem ser realizadas, devendo os materiais biológicos enviados em refrigeração, ou imediatamente em até no máximo 24 horas em temperatura ambiente, para realização de cultura fúngica em laboratório de micologia. A partir do crescimento fúngico, análise morfológica das colônias deverá ser realizada, sendo observada macroscopicamente e inicialmente colônias filamentosas com aspecto

"estrelado" de coloração branca a bege-claro, que pode enegrecer-se gradativamente, formando um aspecto enrugado e aderido ao meio de cultura, ao passo que as colônias leveduriformes são de consistência cremosa e de coloração branca a bege-claro. Microscopicamente, a fase filamentosa é observada através do exame direto das colônias em Lactofenol entre lâmina e lamínula em aumento de 400x, a qual se observa numerosas hifas hialinas e septadas com conidióforos contendo abundantes conídios em sua extremidade em forma de "margarida". A fase leveduriforme é observada através da técnica de Gram em aumento de 1000x com óleo de imersão sobre a forma de células arredondadas, ovaladas ou em formato de "charuto", as quais podem ser encontradas livres ou fagocitadas, as quais são apresentadas por um halo claro (LACAZ et al., 2002; MEIRELES & NASCENTE, 2009; CRUZ, 2011).

3.2 Abordagem Terapêutica Convencional da Esporotricose

No início do século XX, o iodeto de potássio e o iodeto de sódio foram os primeiros medicamentos a serem utilizados no tratamento da esporotricose localizada em humanos (CONTÍ-DIAZ; BERVIAN, 1992), sendo empregados anos mais tarde com eficácia no tratamento de animais, cujas doses recomendadas para felinos são de 10 a 20 mg/kg a cada 12 ou 24h, pela via oral (SHUBACH et al., 2004) e de caninos recomenda-se solução saturada de iodeto de sódio ou potássio a 20% na dose de 40 mg/kg a cada 8 horas, até a plena remissão da lesão, prolongando a terapia por mais 30 dias (LARSSON, 2011). Os felinos são descritos como sensíveis aos iodetos, manifestando toxicidade ou iodismo, com sinais de vômito, espasmos musculares, hipotermia, ptialismo, hiperexcitabilidade, diarreia, hipertermia e cardiomiopatia (NOBRE et al., 2002). Em caninos, os efeitos adversos pelos iodetos são raros, contudo, quando ocorrem, manifestam-se por epífora, corrimento nasal, pelame ressecado, disqueratinização acentuada e êmese, devendo, nestas condições, suspendê-los por no mínimo sete dias, podendo restituir a dose gradativamente (LARSSON, 2011). Devido a estes efeitos, estas drogas passaram a ser substituídas por fármacos derivados dos azóis, que interferem na biossíntese do componente vital da membrana celular: o ergosterol (NOBRE et al., 2002).

Assim, no final dos anos 70, o cetoconazol surgiu como um fármaco promissor, sendo utilizado com sucesso na terapia em felinos na dosagem de 5 a 10 mg/kg/dia

(SCHUBACH et al., 2004). Entretanto, alguns estudos descrevem a sua ineficácia na dose de 10 mg/kg/dia nas formas disseminadas em felinos com ocorrência de efeitos adversos (NOBRE et al., 2001). Em caninos, recomenda-se 15 mg/kg de cetoconazol a cada 12 h por no mínimo 3 meses, entretanto, seu uso é pouco indicado nesta espécie, devido aos efeitos adversos, como vômito, anorexia e náuseas (HEIT & RIVIERE, 1995), mas principalmente pelo seu potencial hepatotóxico (LARSSON, 2011). Ainda, a resposta ao tratamento oral é relativamente lenta, sendo menos útil em infecções graves e agudas (NOBRE et al., 2002).

Entre outros antifúngicos utilizados no tratamento, está a flucitosina, indicada na esporotricose animal em dosagens de 125 a 250 mg/kg/dia, entretanto, efeitos colaterais podem ocorrer, como anemia, leucopenia, trombocitopenia, náuseas, vômitos, diarréia, enterocolite grave e hepatomegalia (NOBRE et al., 2001). Do grupo das alilaminas, a terbinafina apresenta alta atividade *in vitro* contra *Sporothrix* spp. (MARIMON et al., 2008; MEINERZ et al., 2008), sendo a dosagem de 30 mg/kg/dia utilizada com sucesso na esporotricose felina, tanto na forma isolada, quanto associada ao itraconazol (SCHUBACH et al., 2004). Além destes, a anfotericina B também é recomendada na dosagem de 0,15-0,5 mg/kg/dia, por via intravenosa, em dias alternados, totalizando a dose de 4-12 mg/kg (HEIT & RIVIERE, 1995). Embora as doses superiores a 1 mg/kg/dia sejam mais efetivas, seu uso é limitado em cães e gatos, devido aos efeitos nefrotóxicos desencadeados pela maior afinidade da droga ao colesterol da membrana celular do hospedeiro (FILIPIN & SOUZA, 2006). Atualmente, formulações de anfotericina B lipossomal existem no mercado com efeitos tóxicos reduzidos, entretanto, apresentam preços mais elevados (MARTÍNEZ et al., 2014)

Em lesões pequenas e localizadas, o tratamento com calor local é uma alternativa, especialmente em casos cutâneos e linfocutâneos, como relatada a cura clínica em um gato com lesão única e tratado duas vezes ao dia, por sete semanas através da imersão da pata lesada em água quente à 40ºC (HONSE et al., 2010). Entretanto, a termoterapia local é limitada, devido ao fato de depender da localização das lesões, do momento correto para a sua suspensão, e da dificuldade em se determinar a temperatura adequada, além da cooperação do animal na terapia (HONSE et al., 2010). Além do uso de fármacos antifúngicos, uma modalidade de tratamento recentemente adotada com sucesso é a excisão cirúrgica da lesão com posterior utilização de itraconazol, realizada com sucesso em um felino com lesão persistente na

bolsa escrotal e testículos, embora sua principal limitação seja a realização somente em sítios anatômicos que permitam intervenção cirúrgica (GREMIÃO et al., 2006).

Surgido nos anos 90, itraconazol é um derivado triazólico com ação 5 a 100 vezes mais potente e seletiva na célula fúngica e que, devido à eficiência e à baixa toxicidade em relação aos demais antifúngicos, é considerado, atualmente, o fármaco de eleição na esporotricose felina e canina (PEREIRA et al., 2009). O sucesso do itraconazol no tratamento em felinos e caninos é obtido na dose de 10 mg/kg/dia, podendo chegar a 40mg/kg/dia, via oral, a cada 24h por no mínimo três meses, devendo ser prolongado por no mínimo 30 dias após a cura (SCHUBACH et al., 2004; MADRID et al., 2007; MADRID et al., 2010). Resultados similares e satisfatórios também foram obtidos com o uso de itraconazol em caninos com esporotricose localizada no plano nasal (MADRID et al., 2007). Em estudo no Rio Grande do Sul, as lesões cutâneas de felinos com esporotricose regrediram durante os 20 primeiros dias de tratamento com 10 mg/kg/dia de itraconazol, via oral, por três a cinco meses, sendo a cura clínica ocorrida ao final do terceiro mês de tratamento em 50% dos felinos, sem efeitos colaterais aparentes (MADRID et al., 2010). Embora os efeitos adversos do itraconazol em felinos sejam raros, podem ocorrer especialmente, os gastrintestinais, como náuseas, vômitos e desconforto abdominal, e hepatotóxicos, devendo suspender o medicamento temporariamente até a normalização das enzimas hepáticas (PEREIRA et al., 2009).

Em estudos com isolados clínicos humanos de *S*. *schenckii*, *S*. *globosa*, *S*. *albicans* e *S*. *mexicana*, o itraconazol apresentou eficácia nos valores de CIM entre 0.25 a >16 μg/mL, apresentando excelente atividade contra *S*. *brasiliensis* entre 0.25 a 4 μg/mL (RODRIGUES et al., 2014). Cepas de *Sporothrix* spp. têm sido mais suscetíveis ao itraconazol do que ao voriconazol (Mc GINNIS, 2001), assim como demonstrado em em estudo experimental na esporotricose cutânea, o qual demonstrou melhor atividade do itraconazol em relação à terbinafina, que se apresentoue pouco eficaz (ANTUNES, 2009). Meinerz et al. (2007) demonstraram que o itraconazol apresenta excelente atividade fungistática contra isolados felinos e um isolado canino nas concentrações de 0.875 a 1.75 μg/mL. Rodrigues et al. (2014) demonstraram que os valores de CFM para isolados clínicos humanos de *S*. *brasiliensis* foram de 1 a >16 μg/mL; para *S*. *schenckii* e *S*. *globosa*, 0.5 a >16 μg/mL; e para *S*. *mexicana*, 2 a >16 μg/mL.

Em um estudo *in vitro* com 92 cepas do Complexo *Sporothrix* spp., terbinafina e itraconazol foram as drogas mais ativas contra as cepas *S*. *brasiliensis*, *S*. *schenckii*, *S*. *globosa*, *S*. *mexicana* e *S*. *albicans*, seguida de cetoconazol e posaconazol; porém, voriconazol demonstrou baixa atividade antifúngica e fluconazol não apresentou eficácia. Neste estudo, a espécie *S*. *brasiliensis* apresentou melhor resposta aos antifúngicos por ser mais suscetível entre os isolados do Complexo *Sporothrix* spp. (MARIMON et al., 2008), o que difere de um estudo *in vivo*, pois em um caso clínico de esporotricose canina causada por *S*. *brasiliensis*, o uso único de itraconazol não apresentou boa eficácia, sendo o sucesso terapêutico atribuído somente em associação do antifúngico com o uso de imunomodulador 1,3-β-glucana (GUTERRES et al., 2014). Segundo Kohler et al. (2004), isolados clínicos humanos são relatados com baixos níveis de resistência das células de *S*. *schenckii* ao itraconazol, diferentemente de isolados felinos, os quais apresentam elevada resistência *in vitro* aos fármacos.

Estudos de Rodrigues et al. (2014) demonstraram que valores de CIM do itraconazol moderadamente baixos implicam em grande resistência à eliminação de *S*. *brasiliensis*, devido à elevada aptidão genética fúngica em promover uma expansão populacional com grande diversidade no perfil de suscetibilidade antifúngica. Embora os medicamentos fungistáticos sejam capazes de inibir o crescimento fúngico sem provocar sua destruição, a exposição contínua a eles podem induzir as células fúngicas a desenvolver resistência (ANDERSON, 2005), sendo que ainda permanece desconhecido o mecanismo molecular do Complexo *Sporothrix* spp. para essa condição (RODRIGUES et al., 2014). Dentre os fatores que contribuem para o surgimento de cepas resistentes a medicamentos, estão o uso indiscriminado de drogas antifúngicas nas terapias contra diversas enfermidades (SCHUBACH et al., 2004; CERNICKA; SUBIK, 2006), assim como a negligência e/ou interrupção do tratamento pelos proprietários de animais doentes, devido ao tempo prolongado de tratamento e ao alto custo medicamentoso (ELLIS, 2002; ODDS et al., 2003; KOHLER et al.,2004; SCHUBACH et al., 2004; PEREIRA et al., 2009).

Diante desta situação, alternativas terapêuticas são importantes no manejo de casos de resistência, principalmente em pacientes imunocomprometidos, que são mais suscetíveis a infecções oportunistas (ODDS, 2003). Ainda, o alto custo dos medicamentos industrializados, o acesso público ineficiente à assistência médica e farmacêutica, além dos efeitos secundários causados por drogas sintéticas, são alguns

dos fatores contribuintes para o estímulo atual em direcionar as pesquisas para a descoberta de novos agentes antifúngicos a partir de outras fontes terapêuticas, como plantas medicinais (JOHANN et al., 2007).

3.3 Plantas com Atividade Anti-*Sporothrix* spp.

Há uma necessidade contínua e urgente em descobrir novos compostos antifúngicos e compreender seu mecanismo de ação, devido ao aumento frequente de microorganismos resistentes aos medicamentos (KONTOYIANNIS; LEWIS, 2002). O uso de plantas e derivados para fins medicinais é uma prática antiga sendo utilizada no mundo inteiro, principalmente na cultura oriental, adotada por até 80% da população de países em desenvolvimento, e que tem tido uso crescente por povos ocidentais, segundo a Organização Mundial de Saúde – OMS (VEIGA Jr. et al., 2005).

Sabe-se que as plantas medicinais são importantes para milhões de pessoas, que as utilizam como oportunidade única para os cuidados de saúde, mas também, como fontes de novos compostos farmacêuticos (ABAD et al., 2007). Na esporotricose, testes com diversas plantas já demonstraram a possibilidade de novas fontes promissoras para o tratamento da doença (MASOKO et al., 2007; CLEFF et al., 2008; SULEIMANN et al., 2010; STOPIGLIA et al., 2011; JOSHI et al., 2011; JOHANN et al., 2011).

Dentre as plantas pesquisadas no Brasil com comprovação de atividade antifúngica contra *Sporothrix* spp., está o orégano (*Origanum vulgare* L.), pertencente à família Lamiaceae, que na concentração de 250 μL/mL apresentou atividade inibitória *in vitro* contra este fungo (CLEFF, 2010), no qual, dentre os vários constituintes químicos presentes na planta, estão os terpenos, considerados os principais responsáveis pela ação antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001). Em outro estudo, os extratos de flores de girassol (*Helianthus annuus* L.) também apresentaram atividade inibitória *in vitro* contra *Sporothrix* spp., por apresentar baixos valores de CIMs, variando de 3,59 a 14,38 mg/mL, ao passo que os valores para CFMs foram 2 a 8 vezes maiores em relação aos valores da CIMs para atingir a capacidade fungicida (FONTOURA, 2010). A planta popularmente conhecidade por “aroeira” (*Schinus terebinthifolius* L.) também teve sua atividade antifúngica comprovada a partir de extratos com 80% de etanol das suas folhas, na concentração inibitória mínima de 15

μL/ml contra *Sporothrix* spp. (JOHANN et al., 2007). Outras plantas com atividade anti-*Sporothrix* spp. confirmada foram malvaísco (*Herissantia crispa* L.), azedeira (*Rumex acetosa* L.), alecrim-do-campo (*Baccharis dracunlifolia* L.), amora-preta (*Rubus urticaefolius* L.) e caapeba-do-paraná (*Piper regnellii* L.) (JOHANN et al., 2007; FONTOURA, 2010).

Ainda, um estudo com plantas oriundas da África do Sul demonstrou que *Sporothrix* spp. foi sensível aos extratos de *Loxostylis alata* L. (CIM 0,04 mg/mL) e *Ochna natalitia* L. (CIM 0,08 mg/mL) com valores de CIM menores que 0,1 mg/mL (SULEIMAN et al., 2010). *Sporothrix* spp. também teve seu crescimento prejudicado em estudos *in vitro* com extratos e óleos essencias das seguintes plantas: *Mentha arvensis* L., *Alternanthera brasiliana* L., *Combretum vendae* L., *Tagetes lucida* L., *Artemisia ludoviciana* L., *Commiphora harveyi* L., *Khaya anthotheca* L., *Kirkia wilmsii* L. e *Protorhus longifolia* L. (DAMIÁN-BADILLO et al., 2008; SULEIMANN et al., 2010). Em extratos de plantas nativas do México, *Tagetes lucida* L. e *Artemisia ludoviciana* L. também apresentaram atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* (DAMIÁN-BADILLO et al., 2008), assim como extratos e óleos de cúrcuma (*Curcuma longa* L.), alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra* L.), cravo (*Syzygium aromaticum* L.) e citronela (*Perlagonium graveolens* L.), entre outras plantas (APISARIYAKUL et al., 1995; FATIMA et al., 2009; MÁRQUEZ, 2010; SINGH et al., 2012).

Entretanto, observa-se a inexistência de padronização dos testes com plantas medicinais, sendo este um fator de entrave para a comparação dos resultados. Além disso, as plantas pesquisadas devem seguir os mesmos critérios de eficácia, segurança e controle de qualidade adotados para os aloterápicos (KLEIN et al., 2009).

3.4 Plantas da Família Lamiaceae

As plantas da família Lamiaceae incluem 236 gêneros botânicos com cerca de 7500 espécies distribuídas no mundo, em especial, nas áreas tropical e temperada, e são caracterizadas por ervas aromáticas, de hastes quadrangulares e intensa infloração (ANON, 2003), das quais muitas são utilizadas desde a antiguidade por suas qualidades culinárias através de condimentos, ervas e temperos, bem como pelas propriedades antioxidantes e medicinais (DORMAN et al., 2004).

Na medicina popular, as plantas da família Lamiaceae são utilizadas para o tratamento de várias doenças, inclusive asma, cólicas, diarréias, indigestão, doenças infecciosas, dores musculares, náuseas e reumatismo, além do fato de possuirem uma variedade de atividades terapêuticas, como antiinflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica e antiviral (ANGIONI et al., 2004; DORMAN et al., 2004; SANTOYO et al., 2005; SELLAMI et al., 2009). As plantas desta família apresentam uma variedade de metabólitos secundários, como terpenóides e flavonóides (DORMAN et al., 2004), sendo os terpenos considerados os principais componentes com ação antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001).

A bioatividade de óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L. são bem conhecidos, entretanto, estudos com extratos hidroalcoólicos e aquosos são escassos, principalmente em preparações de infusão e decocção para aplicações terapêuticas (EL-ASHMAWY et al., 2005; TSAI et al., 2007; AHMED et al., 2011; LICINA et al., 2013; MARTINS et al., 2014). Sobre a forma de extratos, a infusão de *O. vulgare* L. é recomendada em inflamações e infecções cutâneas para uso tópico e apresenta propriedades digestivas, expectorantes, antissépticas e antiespasmódicas, assim como a infusão da *O. majorana* L., conhecida pela ação antiinflamatória, e a infusão de *R. officinalis* L. com potencial cicatrizante, antiespasmódico e antimicrobiano no uso interno e externo, além de atuar como antisséptico bucal e ser utilizado em casos de obstrução nasal (SIMÕES et al., 2003; VANACLOCHA; CAÑIGUERAL, 2003; LORENZI; MATOS, 2006; GIORDANI et al., 2012). Sobre óleos essenciais, *O. vulgare* L. é tradicionalmente utilizado pela atividade analgésica e expectorante (SARTORATTO et al., 2004).

Embora as plantas medicinais tenham suas aplicações populares, seu uso deve ser feito com cautela e cuidados, pois, em excesso, pode provocar efeitos adversos. O óleo essencial de orégano pode ser utilizado internamente ou topicamente, mas sua aplicação deve ser usada com precaução, devido à possibilidade em desencadear fotossensibilidade, neurotoxicidade e hepatotoxicidade (MARTINS et al., 2014), sendo que nunca deve ser utilizado topicamente em membranas mucosas em concentrações superiores a 1%, devido aos possíveis efeitos irritantes na pele e de queimação (TISSERAND; BALACS, 1995). Porém, seu uso pode ser seguro quando usado corretamente e em diluições (MARTINS et al., 2014). Em um estudo de Cleff et al. (2008), aplicações orais e intravaginais diárias de *O. vulgare* L. a 3% por 30 dias em

ratas adultas Wistar não provocou alterações macro ou microscópicas nos tecidos analisados, nem demonstrou sinais de toxicidade.

O óleo essencial de *R*. *officinalis* L. pode causar efeito irritante em tecido cutâneo e gastrintestinal, bem como nefrite, alteração de sono e reação de hipersensibilidade, e deve ter seu uso controlado em gestante, pois pode aumentar a motilidade uterina e provocar aborto (CARDOSO et al., 2000; VEIGA Jr. et al., 2005). Em um estudo de toxicidade, óleo essencial de *R*. *officinalis* L. a 24% e *O*. *majorana* L. a 6% foram testadas em animais experimentais, provocando irritação cutânea e ocular aguda moderadas com regressão das lesões de eritema e escara em 21 dias, ao passo que o óleo de *O*. *majorana* L. 6% apresentou irritação cutânea e ocular aguda leve com reversão dos sinais clínicos de edema e eritema nos animais em sete dias (SANTIN, 2013).

Dentre as propriedades antimicrobianas, diversos estudos têm demonstrado o potencial das plantas da família Lamiaceae, como *Origanum majorana* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. nas formas de extratos aquosos, alcoólicos, metanólicos, clorofórmios e óleos essenciais contra diferentes agentes patogênicos, como *Bacillus* sp., *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Proteus* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptococcus* sp., *Staphylococcus* sp. e *Salmonella* sp. (NOSTRO et al., 2004; PEPELJNJAK et al., 2005; VÁGI et al., 2005; CHAUDHRY et al., 2007; LUQMAN et al., 2007; ROSATO et al., 2007; SANTORO et al., 2007; TSAI et al., 2007; BUSATTA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; PACKER; LUZ, 2009; SAEED; TARIQ, 2009; AHMED et al., 2011; ASHRAF et al., 2011; MARTINS et al., 2014).

A atividade antifúngica das plantas da família Lamiaceae também é observada em diferentes estudos que demonstraram suscetibilidade de fungos patogênicos, como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans; Malassezia pachydermatis; Trichophyton* spp.; *Microsporum* spp. e *Aspergillus* spp. em diferentes concentrações e extratos de *O*. *vulgare* L., *O*. *majorana* L. e *R*. *officinalis* L. (MANOHAR et al., 2001; CHAMI et al., 2004; GIORDANI et al., 2004; LUQMAN et al., 2007; CLEFF et al., 2008; PACKER; LUZ, 2009; SAEED; TARIQ, 2009; CLEFF et al., 2010; GALUPPI et al., 2010; SOUZA et al., 2010). Entretanto, os estudos nestas plantas concentram-se principalmente em óleos essenciais, sendo escassas as pesquisas com infusões, decocções e extratos hidroalcoólicos (VÁGI et al., 2005; CHAUDHRY et al., 2007;

TSAI et al., 2007; SAEED; TARIQ, 2009; AHMED et al., 2011; ASHRAF et al., 2011; MARTINS et al., 2014). O uso de extratos aquosos de infusão e decocção, bem como de outras formas, podem ser incorporadas em formulações para uso antimicrobiano a fim de se evitar os efeitos tóxicos demonstrados em grande parte pelos óleos essenciais (MARTINS et al., 2014), e cujos estudos devem ser constatemente explorados com finalidade terapêutica.

Na forma de óleo essencial, *Origanum vulgare* L. demonstrou seu potencial antifúngico contra leveduras e outros fungos patogênicos, como *Candida* sp. (MANOHAR et al., 2001; CHAMI et al., 2004; CLEFF et al., 2008; HELAL; STELATO, 2009; SOUZA, 2010; VALE-SILVA et al., 2012), *Cryptococcus neoformans* (VALE-SILVA et al., 2012); *Malassezia pachydermatis* (RUSENOVA; PARVANOV, 2009; CLEFF et al. 2010; GALUPPI et al., 2010), *Trichophyton* spp. (SOUZA, 2010; VÁLE-SILVA et al., 2012), *Microsporum* spp. (SOUZA, 2010; VALE-SILVA et al., 2012), *Epidermophyton* sp. (VALE-SILVA et al., 2012), *Aspergillus* spp. (CLEFF et al., 2010; SOUZA, 2010; VALE-SILVA et al., 2012).

Em um estudo com três óleos essenciais de orégano coletados em diferentes locais de Portugal, Vale-Silva et al. (2012) demonstraram a suscetibilidade de *Candida albicans, C. tropicalis, C. krusei, C. guillermondii, C. parapsilosis, Cryptococcus neoformans, Trichophyton mentagrophytes, T. rubrum, Microsporum canis, M. gypseum, Epidermophyton floccosum, Aspergillus fumigatus* e *A. flavus* a todos os óleos nas concentrações de CIM e CFM de 0.32 a 10 µL/mL pelas técnicas de microdiluição em caldo (CLSI M27-A3 e M38-A2). Ainda, *Candida albicans* teve a produção do tubo germinativo complemetamente inibido em ambas amostras (VALE-SILVA et al., 2012). Em outro estudo, óleo essencial de orégano apresentou CIM de 2 mg/mL sobre *C. albicans* (SARTORATTO et al., 2004). Na forma de extratos, *O. vulgare* L. tem demonstrado atividade sobre a forma de extrato aquoso, metanólico e clorofórmico em *Aspergillus niger, A. flavus* e *A. pterus* (ASHRAF et al., 2011).

Estudos com compostos isolados têm demonstrado que várias substâncias químicas presentes nos extratos apresentaram atividade antifúngica similares (VALE-SILVA et al., 2012; NARDONI et al., 2014). Os compostos químicos carvacrol, α-terpineol, linalool e γ-terpineno testados isoladamente sobre diferentes espécies de *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichophyton* spp., *Microsporum* ssp.,

Epidermophyton spp. e *Aspergillus* spp. apresentaram atividade antifúngica, sendo que carvacrol apresentou menores valores capazes de conferir inibição e eliminação do crescimento fúngico de 0.04 a 0.32 µL/mL (VALE-SILVA et al., 2012). Em *Malassezia pachydermatis*, timol e carvacrol apresentaram os menores valores de CIM (0.25% e 0.05%, respectivamente), seguido de p-cimeno, 1,8-cineol, limoneno e mentol (ambos a 1%), linalool (2.5%) e mentona e α-pineno (ambos com 5%) (NARDONI et al., 2014).

O óleo de *R. officinalis* L. apresentou atividade antifúngica contra isolados leveduriformes de *Candida* sp., *Malassezia* sp. e *Trichosporon* sp. nas concentrações de 0,03 a 0,12 µL/mL (SANTIN et al., 2013). Sobre a forma de extrato glicólico, *R. officinalis* L. apresentou atividade contra *C. albicans, C. tropicalis, C. glabrata* (COSTA et al., 2009). Em *Candida albicans* resistente a diferentes antibióticos, como metronidazol, benzoilmetronidazol, nistatina e anfotericina B (MIC≥1024 µg/mL), o óleo essencial de *R. officinalis* L. apresentou atividade anti-*Candida* a 512 µg/mL, ao passo que em *Candida krusei*, a associação de benzoilmetronidazol com óleo essencial de alecrim foi mais efetivo do que quando utilizado o antibiótico isoladamente (BARRETO et al., 2014).

A atividade antifúngica de manjerona (*Origanum majorana* L.) tem sido testada nas concentrações de 2.5 a 4600 µg/mL contra diversas espécies de fungos dos gêneros *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Rhizopus* sp., *Alternaria* sp. e *Candida* sp. (BUSATTA, 2006). Contra *Aspergillus niger*, extrato alcoólico de manjerona apresentou atividade inibitória à concentração de 2,5% (VÁGI et al., 2005).

Em um estudo experimental de dermatite canina por *Malassezia pachydermatis*, 20 animais foram testados com o produto comercial Malacalm®, composto de óleos essenciais de *Citrus aurentium* e *Lavandula officinalis* a 1% e *Origanum vulgare, Origanum majorana, Mentha piperita* e *Helichrysum italicum* var. *italicum* a 0.5%, por via tópica, duas vezes ao dia durante um mês, ao passo que 10 animais foram tratados convencionalmente com cetoconazol (10 mg/kg/dia) com clorexidine a 2% semanalmente por 3 semanas, demonstrando que ambos tratamentos foram satisfatórios com remissão dos sinais clínicos sem efeitos adversos (NARDONI et al., 2014), embora o uso de cetoconazol possa provocar efeitos adversos (MAYER et al., 2008).

Em outro estudo experimental, uma mistura de óleos essenciais de *Thymus serpillum* a 2% e de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. a 5% ambos em

óleo de amêndoa doce (*Prunus dulcis*) foi testado em sete felinos com dermatofitose por *M*. *canis*, dos quais quatro animais foram recuperados clinicamente e laboratorialmente e cuja atividade anti-*Microsporum* sp. foi fortemente atribuída aos óleos essenciais de *T*. *serpillum* e *O*. *vulgare* L., por apresentaram menores valores de CIM (0.025-0.1% e 0.025-0.05%, respectivamente) e de CFM (0.05% e 0.1%, respectivamente), ao passo que *R*. *officinalis* L. necessitou de maiores concentrações de CIM entre 1-5% e de CFM a 7.5% (MUGNAINI et al., 2012). O mesmo produto formulado por Mugnaini et al. (2012) foi testado em 13 ovelhas com dermatofitose por *Trichophyton mentagrophytes* e tratadas duas vezes ao dia por via tópica durante 15 dias com uma mistura de óleos essenciais de *Thymus serpillum* a 2% e de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. a 5% ambos em óleo de amêndoa doce (*Prunus dulcis*) apresentaram melhores sinais de remissão dos sinais clínicos sem efeitos adversos, do que outros seis animais tratados convencionalmente com iodo tópico a 5%, diariamente por cinco dias, semanalmente durante três tratamentos. A atividade anti-dermatófita foi observada nos óleos essenciais de *R*. *officinalis* L. e *O*. *vulgare* L., com MIC de 5% e 2.5%, respectivamente, ao passo que *T*. *serpillum* L. apresentou melhor atividade com MIC de 0.1%. Os compostos majoritários desse produto formulado foram timol, carvacrol, 1,8-cineol, α-pineno e p-cimeno, os quais foram testados isoladamente em fungos pela técnica de microdiluição, sendo a atividade anti-*Trichophyton* spp. melhor atribuída às duas primeiras substâncias, com valores de CIM de 0.125% a 0.0625% (MUGNAINI et al., 2013).

Estudos das plantas da família Lamiaceae contra cepas do Complexo *Sporothrix* ainda são escassos, porém, estudos *in vitro* já demonstraram sua atividade. O óleo essencial de *O*. *vulgare* L. na concentração de 250 μL/mL conferiu atividade inibitória sobre o crescimento de *Sporothrix schenckii* (CLEFF et al., 2008), bem como a 0.3% (CLEFF et al., 2010), o qual também foi sensível ao óleo essencial do alecrim, que apresentou atividade inibitória na concentração de 11 mg/mL com halo de inibição de 2,5 mm de diâmetro em teste de disco-difusão em ágar (LUQMAN et al., 2007).

Entretanto, estudos referentes à suscetibilidade de *Sporothrix* spp. aos extratos aquosos ou hidroalcoólicos de *O*. *vulgare* L., *O*. *majorana* L. e *R*. *officinalis* L. não foram documentados na literatura consultada, e nem na forma de óleo essencial de *O*. *majorana* L., os quais merecem estudos investigativos, devido ao potencial antimicrobiano contra diversos agentes patogênicos.

ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1

Eficácia de Óleos Essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum vulgare* L. de diferentes origens frente ao Complexo *Sporothrix*

Stefanie Bressan Waller; Isabel Martins Madrid; Vanny Ferraz; Rogério Antonio Freitag; Marlete Brum Cleff; Mário Carlos Araújo Meireles; João Roberto Braga de Mello

Artigo formatado sobre as normas da revista *Brazilian Journal of Microbiology*

EFICÁCIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Rosmarinus officinalis* L. E *Origanum vulgare* L. DE DIFERENTES ORIGENS FRENTE AO COMPLEXO *Sporothrix*

Stefanie Bressan Waller[1*]; Isabel Martins Madrid[2]; Vanny Ferraz[3]; Rogério Antonio Freitag[4]; Marlete Brum Cleff[5]; Mário Carlos Araújo Meireles[6]; João Roberto Braga de Mello[7]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.
[2] Prefeitura Municipal de Pelotas, Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Pelotas-RS, Brasil.
[3] Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brasil.
[4] Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[5] Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[6] Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[7] Deparmento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.

***Autor para correspondência**: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS, Brasil. Rua São Francisco da Califórnia, 90/1001, Porto Alegre/RS, Brasil. CEP: 90550-080. Tel.: +55 53 9953 824. E-mail: waller.stefanie@yahoo.com.br

RESUMO

Esporotricose é uma doença zoonótica causada por fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* e que apresenta importância em saúde pública no Brasil. O tratamento de eleição da micose é feito com itraconazol, entretanto, o uso indiscriminado de antifúngicos sem acompanhamento veterinário tem favorecido o surgimento de cepas resistentes. Na tentativa de buscar novas alternativas terapêuticas, recorreu-se às pesquisas em plantas medicinais da família Lamiaceae, cuja produção de óleos essenciais é rica em compostos com atividade antifúngica contra diversos fungos patogênicos, entretanto, as pesquisas em esporotricose são escassas. Assim, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais extraídos das folhas de *Rosmarinus*

officinalis L. (alecrim) e *Origanum vulgare* L. (orégano) obtidos do Chile, e de óleos obtidos comercialmente (Ferquima® - Indústria e Comércio Ltda, Brasil) originados da Tunísia e Moldávia, respectivamente, contra *Sporothrix* spp. (*n*: 25) isolados de humanos e animais com esporotricose, um isolado padrão e um de ambiente, através do teste de Microdiluição em Caldo (CLSI M27-A3). Todos os isolados foram sensíveis aos dois tipos de óleos essenciais de cada planta, inclusive em isolados resistentes ao itraconazol, não havendo diferença estatística ($p<0.05$). Os valores da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) variaram de ≤2,25 a 36 mg/mL para os óleos de orégano e ≤2,25 a 18 mg/mL para os óleos de alecrim. Através da cromatografia gasosa, os compostos majoritários do óleo essencial extraído de orégano foram α-terpineno, 4-terpineol e timol, e do comercial foram carvacrol, γ-terpineno e p-pineno, ao passo que em ambos óleos essenciais de alecrim foram α-pineno e 1,8-cineol. O estudo demonstrou que ambos tipos de óleos das plantas testadas apresentaram atividade anti-*Sporothrix* spp., inclusive sobre cepas resistentes a itraconazol, e são promissores para o tratamento da esporotricose.

Palavras-chave: esporotricose; plantas medicinais; orégano; alecrim.

INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma doença causada por fungos do Complexo *Sporothrix*, como *S. schenckii* var. *schenckii*, *S. schenckii* var. *luriei*, *S. brasiliensis, S. globosa, S. mexicana* e *S. albicans* (Marimon *et al*., 2007, 2008). A enfermidade é adquirida através da inoculação traumática de conídios presentes em solo, plantas e matéria orgânica, bem como pode ser transmitida através da arranhadura e mordedura de felinos doentes (Xavier *et al*., 2004; Cruz, 2011). No Brasil, *Sporothrix brasiliensis* é relatado com alta

prevalência nos casos de surtos de esporotricose felina, e é considerada a espécie mais patogênica do Complexo *Sporothrix* (Rodrigues *et al*., 2013).

As lesões da esporotricose são frequentemente limitadas aos tecidos cutâneo e subcutâneo e ocorrem inicialmente no ponto de inoculação, com formação de nódulos que ulceram, liberando secreção, podendo ou não envolver o sistema linfático (Larsson, 2011; Madrid *et al*., 2011). Em cães e gatos, sinais extracutâneos podem surgir, principalmente respiratórios, como dispnéia, descarga nasal e espirros, em especial nos casos em que a inoculação fúngica tenha ocorrido no plano nasal, podendo estar associado ao edema alveolar (Schubach *et al*., 2004; Borges, 2007;. Madrid *et al*, 2011).

O tratamento de escolha para a esporotricose felina e canina é feita com itraconazol, devido à eficácia e segurança terapêutica em relação aos demais antifúngicos (Pereira *et al*, 2010). Entretanto, o seu uso indiscriminado nas terapias contra diversas doenças fúngicas tem favorecido o surgimento de cepas resistentes em humanos e animais (Marimon *et al*., 2008; Pereira *et al*., 2010; Rodrigues *et al*., 2014).

Essa problemática tem estimulado a busca por novos compostos químicos eficazes, tais como em plantas medicinais, cujo uso em medicina popular para tratar, curar e prevenir doenças é uma das práticas mais antigas da humanidade (Veiga Jr. *et al*., 2005). Entretanto, apenas cerca de 30% dos medicamentos antimicrobianos no mercado são derivados de produtos naturais e os recursos em elaborar fármacos a partir de plantas são pobremente explorados (Chattopadhyay *et al*., 2009). Sabe-se que diversas plantas medicinais apresentam atividade antifúngica, incluindo contra fungos causadores da esporotricose (Luqman *et al*., 2007; Cleff *et al*., 2008). Dentre elas, as plantas da família Lamiaceae são conhecidas pela produção de óleos ricos em compostos fenólicos, os quais estão relacionados às propriedades antimicrobianas (Bozin *et al*., 2007).

Nesta família botânica, os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) são largamente utilizados na culinária, em aplicações terapêuticas e na indústria de cosméticos e de alimentos para prevenir a degradação oxidativa de alimentos contendo lipídeos (Lambert *et al*., 2001; Baydar *et al*., 2004; Luqman *et al*., 2007). Alecrim e orégano tem sido explorados cientificamente por suas propriedades antimicrobianas contra diversos patógenos, inclusive fúngicos, como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans, Malassezia pachydermatis, Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Aspergillus* spp. (Manohar *et al*., 2001; Chami *et al*., 2004; Luqman *et al*., 2007; Cleff *et al*., 2008; Packer e Luz, 2009; Saeed e Tariq, 2009; Cleff *et al*., 2010; Galuppi *et al*., 2010; Souza *et al*., 2010), e também cepas de *Sporothrix schenckii* (Luqman *et al*., 2007; Cleff *et al*., 2008), embora seus estudos na esporotricose sejam escassos. Este estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de origem comercial e extraídos das partes aéreas de *R*. *officinalis* L. e *O*. *vulgare* L. contra fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* isolados de humanos e animais com esporotricose.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

Os óleos essenciais comerciais e extraídos das partes aéreas de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. foram testados para comparação da atividade antifúngica. Os óleos comerciais foram adquiridos com certificado de qualidade e de origem da Moldávia para *O*. *vulgare* L. (Lote 212) e da Tunísia para *R*. *officinalis* L. (Lote 141), e extraídos através da destilação por arraste a vapor (Ferquima® – Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista/SP, Brasil). Para obtenção dos óleos durante o

experimento, partes aéreas de ambas as plantas foram adquiridas com certificações botânicas (Luar Sul® – Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda., Santa Cruz do Sul/RS, Brasil), sendo originadas do Chile, e foram submetidas à extração com arraste de vapor em aparelho de Clevenger por 4 horas (Farmacopéia Brasileira IV). Posteriormente, os óleos foram secos em Na_2SO_4 (sulfato de sódio anidro p.a), concentrados em N_2 (ultra puro, 99,99%, White Martins) e estocados em frascos âmbar sob refrigeração.

Determinação da Composição dos Óleos Essenciais

A análise química dos óleos essenciais extraídos foi realizada por cromatografia gasosa GC/FID (Shimadzu, modelo 2010), equipado com coluna de sílica DB-5 (30m X 0.25mm X 0.25µm) à temperatura inicial de 40ºC, com aumento na taxa de 2ºC/minuto até atingir 145ºC, a partir da qual a taxa foi de 10ºC/minuto para atingir 280ºC, permanecendo nessa temperatura por 10 minutos. Soluções de óleos a 5000 mg/L foram preparadas em hexano, e os padrões cromatográficos a 40 mg/L, sendo α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-terpineno, *p*-cymeno, limoneno, 1,8-cineol, terpinoleno, linalool, 4-terpineol, α-terpineol, timol e carvacrol injetados na coluna cromatográfica a um volume de 1 µL e os constituintes identificados por comparação do tempo de retenção entre os padrões e as amostras analisadas.

Nos óleos comerciais, a análise foi realizada através de cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID) em HP 7820A (Agilent) equipada com coluna HP-5 (30m X 0.32mm X 0.25µm) à temperatura inicial de 70ºC e adição de 3ºC/min até atingir 240ºC. A temperatura do injetor foi de 250ºC e do detector FID, 260ºC. A velocidade de arraste do gás hidrogênio foi de 3 mL/min, e split 1:30. Soluções dos óleos foram diluídas em

clorofórmio a 1% e injetadas no cromatógrafo a um volume de 1 μL. Os dados foram adquiridos através do programa EZChrom Elite Compact® (Agilent).

Isolados do Complexo *Sporothrix*

Vinte e cinco isolados fúngicos do Complexo *Sporothrix* foram utilizados, sendo oriundos da micoteca do Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária (Universidade Federal de Pelotas/UFPel, Pelotas, RS, Brasil). Os isolados foram provenientes de casos clínicos de humanos (*n*: 3), caninos (*n*: 7) e felinos (*n*: 13) com esporotricose e um isolado ambiental de solo (*n*: 1), sendo também testada a cepa padrão IOC 1226 (Fundação Oswaldo Cruz/Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todos os isolados clínicos identificados micologicamente encontravam-se estocados na fase filamentosa em tubos estéreis contendo ágar batata-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e refrigerados em temperatura média de 4ºC.

Teste de Suscetibilidade Antifúngica

A atividade antifúngica foi determinada através da técnica de microdiluição em caldo em microplacas de 96 poços, em duplicata, seguindo as diretrizes do documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008), adaptada para o uso de fitofármacos. Subculturas fúngicas em meio Brain-Heart-Infusion (BHI/Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) à 35 °C por 48 horas foram realizadas para ativar a fase leveduriforme de *Sporothrix* spp. Os óleos essenciais foram testados nas concentrações de 2.25 a 72 mg/mL. Itraconazol (Cepav Pharma Ltda., São Paulo/SP, Brasil) foi utilizado como controle positivo e testado nas concentrações de 0.03 a 16 μg/mL, conforme as diretrizes do documento. Os resultados foram expressos em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

157 **Análise Estatística**

158 A análise estatística foram realizados através da análise de variância e comparação das
159 médias geométricas dos dados de acordo com o teste de Tukey através do *software*
160 estatístico BioEstat® na versão 5.3 e o valor $p<0.05$ considerado de significância.

161

162 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

163 O tratamento convencional da esporotricose em humanos e animais é feito com
164 itraconazol, considerado o antifúngico de eleição para a enfermidade (Madrid *et al*.,
165 2010; Rodrigues *et al*., 2014). De acordo com os resultados da Tabela 1, a CIM do
166 itraconazol para os isolados variou de ≤0,03 a maior que 16 µg/mL e a CFM variou de
167 0.25 a maior que 16 µg/mL. A resistência antifúngica foi observada mediante a
168 avaliação da CIM e CFM, sendo que um isolado clínico de felino não foi inibido
169 (CIM>16 µg/mL), ao passo que seis isolados felinos e um de canino apresentaram CFM
170 superior a 16 µg/mL do itraconazol. Considerado um problema em saúde pública, a
171 resistência dos fungos do Complexo *Sporothrix* ao itraconazol já foi demonstrada
172 (Rodrigues *et al*., 2014). Interessantemente, os isolados fúngicos resistentes ao
173 itraconazol foram sensíveis a todos os óleos essenciais testados entre ≤2.25 a 36
174 mg/mL. Óleos de orégano e alecrim também apresentaram atividade contra bactérias e
175 fungos resistentes a ciprofloxacina, anfotericina B e clotrimazol (Luqman *et al*., 2007;
176 Maida *et al*., 2014).

177 **Tabela 1**. Atividade antifúngica de óleos essenciais extraídos e comerciais de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. contra fungos do
178 Complexo *Sporothrix schenckii*.

Origem dos Isolados do Complexo *Sporothrix schenckii*		*Origanum vulgare* L. (mg ml^{-1})				*Rosmarinus officinalis* L. (mg ml^{-1})				Itraconazol (µg ml^{-1})	
		Extraído		Comercial		Extraído		Comercial			
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Humana (*n*: 3)	Variação	≤2.25	≤2.25 – 4.5	18	18	≤2.25 – 4.5	≤2.25 – 4.5	≤2.25 – 9	≤2.25 – 18	0.5	0.5 – 2
	50%	≤2.25	4.5	18	18	≤2.25	≤2.25	≤2.25	≤2.25	0.5	1
	90%	≤2.25	4.5	18	18	4.5	4.5	9	18	0.5	2
Canina (*n*: 7)	Variação	≤2.25	≤2.25 – 4.5	≤2.25 – 36	≤2.25 – 36	≤2.25	≤2.25 – 4.5	≤2.25 – 18	≤2.25 – >72	0.5 – 8	1 – >16
	50%	≤2.25	≤2.25	4.5	4.5	≤2.25	≤2.25	4.5	9	1	2
	90%	≤2.25	≤2.25	9	18	≤2.25	4.5	18	36	2	16
Felina (*n*: 13)	Variação	≤2.25 – 9	≤2.25 – 9	≤2.25 – 18	≤2.25 – 36	≤2.25 – 18	≤2.25 – 72	≤2.25 – 9	≤2.25 – 18	≤0.03 – >16	0.25 – >16
	50%	≤2.25	≤2.25	4.5	9	≤2.25	≤2.25	4.5	4.5	2	4
	90%	4.5	9	18	36	18	36	9	9	16	>16
Solo Ambiental (*n*: 1)	Variação	≤2.25	≤2.25	18	18	≤2.25	≤2.25	9	18	0.5	0.5
IOC 1226 (*n*: 1)	Variação	≤2.25	≤2.25	≤2.25	≤2.25	≤2.25	≤2.25	18	36	1	8
Todos (*n*: 25)	Variação	≤2.25 – 9	≤2.25 – 9	≤2.25 – 36	≤2.25 – 36	≤2.25 – 18	≤2.25 – 72	≤2.25 – 18	≤2.25 – >72	≤0.03 – >16	0.25 – >16
	50%	≤2.25	≤2.25	9	9	≤2.25	≤2.25	4.5	9	2	4
	90%	4.5	4.5	18	36	18	36	18	36	16	>16

179 50% e 90% referem-se à inibição (CIM) e à eliminação (CFM) do crescimento fúngico em relação ao total da população.

De acordo com a Tabela 1, o óleo extraído de *O*. *vulgare* L. apresentou melhores resultados que o comercial, os quais variaram na CIM e CFM de ≤2.25 a 9 mg/mL e de ≤2.25 a 36 mg/mL, respectivamente, diferindo estatisticamente ($p<0.05$). Assim como no presente estudo, Cleff *et al*. (2008) também demonstraram a sensibilidade de *S*. *schenckii* na CIM de 250 µL/mL, assim como Cleff *et al*. (2010) na CIM entre 250 a 500 µL/mL. Embora a expressão de valores dos resultados tenha sido diferente, os estudos corroboram com nossos dados, pois demonstram a atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* de orégano.

Outros microorganismos de importância em medicina veterinária também foram sensíveis ao óleo extraído de óregano, *Malassezia pachydermatis*, *Aspergillus* spp. e *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Epidermophyton* spp. em CIM variáveis entre 15 a 500 µL/mL (Cleff *et al*., 2010) e 0.32 a 10 µL/mL (Vale-Silva *et al*., 2012). Cleff *et al*. (2013) compararam a atividade antifúngica de oito óleos comerciais de *O*. *vulgare* L. originados do Uruguai e Chile e demonstraram que todos os produtos testados apresentaram atividade contra *Candida* spp. nas concentrações de 0.065 a 1.0%. Em óleo comercial, 42 isolados clínicos de *M*. *pachydermatis* foram sensíveis ao orégano nas CIM entre ≤1.87 a 7 mg/mL (Santin *et al*., 2014).

Em relação ao alecrim, Luqman *et al*. (2007) demonstraram a atividade anti-*Sporothrix* spp. do óleo essencial extraído das folhas, através da mesma metodologia empregada em nossos estudos, na CIM de 11 mg/mL, porém não foi observada atividade fungicida nessa concentração. Em comparação aos nossos resultados, ambos óleos de alecrim apresentaram atividade satisfatória em concentrações inferiores, visto que a CIM_{50} e CFM_{50} de todos os isolados e cepa testados foi ≤2.25 mg/mL para o óleo extraído, e

para o óleo comercial foram, respectivamente, 4.5 mg/mL e 9 mg/mL. Ainda, a CIM_{90} e CFM_{90} de ambos óleos foi de 18 mg/mL e 36 mg/mL, respectivamente, demonstrando seu potencial anti-*Sporothrix* spp. contra todos os isolados.

Dentre outros fungos patogênicos, *C. albicans* tem sido inibida pelo óleo essencial de alecrim em diferentes concentrações: 5.6 µL/mL (Giordani *et al*., 2004), 30 µL/mL (Bozin *et al*., 2007) e 900 µL/mL (Angioni *et al*., 2004). Em *C. albicans* isolada da mucosa vaginal de cadelas, a CIM variou de 2.5 a 10 µL/mL e a CFM entre 5 a 10 µL/mL, sendo que *C. parapsilosis, C. krusei, C. lusitanie* e *C. dubliniensis* foram sensíveis na CIM de 1.25 a 5 µL/mL e CFM de 5 a 10 µL/mL (Cleff *et al*., 2012). Em concentrações superiores, *C. albicans* foi sensível às CIM de 5.5 mg/mL e CFM de 11 mg/mL (Luqman *et al*., 2007). Para os fungos dermatófitos *Trichopyton mentagrophytes, T. tonsurans, T. rubrum, Epidermophyton floccosum* e *Microsporum canis*, óleo de alecrim apresentou atividade inibitória entre 15 a 30 µL/mL (Bozin *et al*., 2007). Em óleo essencial de alecrim adquirido comercialmente, Santin (2013) demonstrou eficácia *in vitro* contra *Malassezia pachydermatis, Candida spp*. e *Trichosporon asahii*, nas CIM e CFM entre ≤1.87 a 30 mg/mL.

À menor concentração testada (2.25 mg/mL), 76% (19/25) e 88% (22/25) dos isolados fúngicos foram inibidos pelos óleos extraídos de orégano e alecrim, respectivamente, sendo que 60% (15/25) foram impedidos de crescer nesta concentração (CFM). Em comparação aos óleos comerciais, menor proporção de isolados suscetíveis foi observada, pois houve inibição em 28% (07/25) para ambas plantas e eliminação do crescimento em 20% (05/25) para óleo de orégano e 16% (04/25) para alecrim. Embora os estudos estejam concentrados em óleos essenciais extraídos de plantas coletadas, ressalta-se a necessidade de estudar a atividade de óleos essenciais comerciais, visto que sua apresentação é facilmente disponível à população. De acordo com Veiga Jr. *et al*.

(2005), é cada vez mais comum o uso de plantas medicinais pelas pessoas devido aos benefícios à saúde pública, os quais tem sido comercializados pela indústria.

Os óleos comercial e extraídos das partes aéreas de *R*. *officinalis* L. apresentaram atividade anti-*Sporothrix* spp. similar ($p>0.05$), no entanto, observou-se que o óleo extraído das partes aéreas de *O*. *vulgare* L. apresentou melhor eficácia que o óleo comercial ($p<0.05$), sendo esse achado atribuído à composição química destes produtos. De acordo com as análises cromatográficas, a composição química entre os óleos do *O*. *vulgare* L. diferiu, sendo terpineno, 4-terpineol e timol os compostos majoritários do óleo extraído das partes aéreas de *O*. *vulgare* L. (Figura 1), ao passo que no óleo comercial, os compostos majoritários corresponderam ao carvacrol, γ-terpineno e *p*-cimeno (Figura 2), corroborando esses resultados com os demais estudos em análise química de *O*. *vulgare* L. (Cleff *et al*., 2008; Cleff *et al*., 2010; Maida *et al*., 2014).

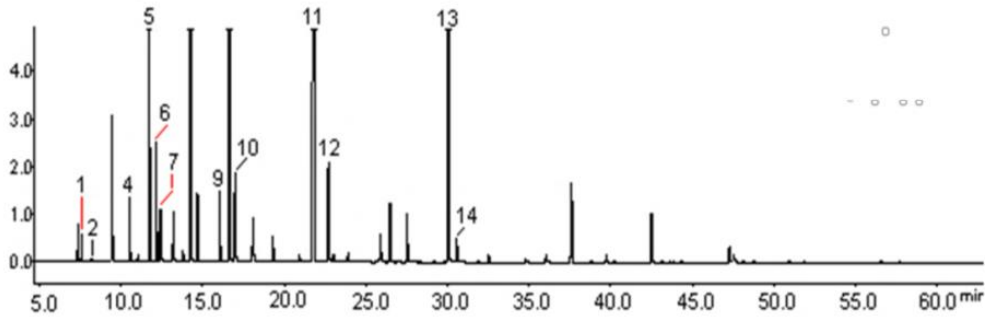

Figura 1. Constituintes identificados no óleo essencial extraído de partes aéreas de *Origanum vulgare* L. por cromatografia gasosa (CG-FID): α-pineno (1), canfeno (2), β-pineno (3), mirceno (4), α-terpineno (5), p-cimeno (6), limoneno (7), 1,8-cineol (8), terpinoleno (9), linalool (10), terpinen-4-ol (11), α-terpineol (12), timol (13) e carvacrol (14).

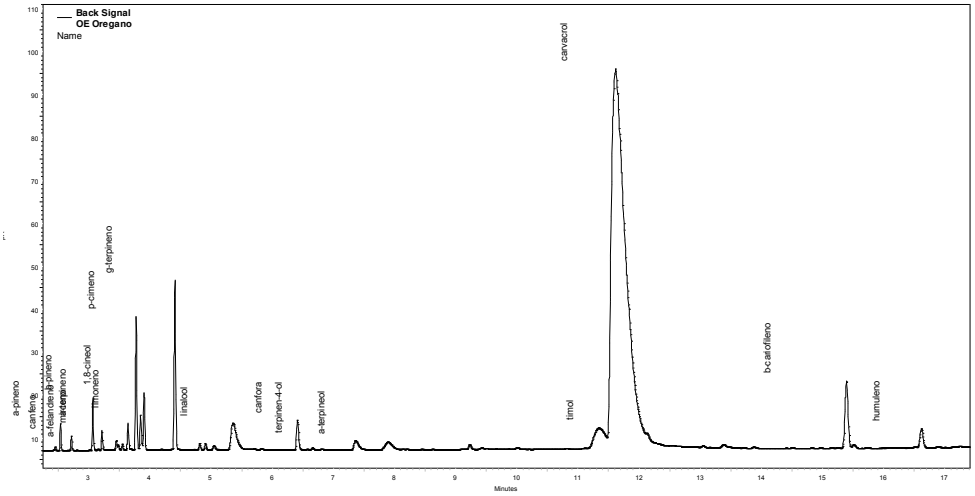

Figura 2. Constituintes identificados no óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* L. por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID): α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-felandreno, α-terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, γ-terpineno, linalool, cânfora, terpinen-4-ol, α-terpineol, timol, carvacrol, β-cariofileno, humuleno e outros constituintes.

Nos óleos comercial e extraído das partes aéreas de *R*. *officinalis* L., 1,8-cineol e α-pineno foram as substâncias majoritárias para ambos produtos (Figuras 3 e 4), os quais corroboram com outros estudos (Kabouche *et al*., 2005; Jiang *et al*., 2011; Maida *et al*., 2014). Ambos compostos majoritários já foram relacionados ao potencial antimicrobiano, uma vez que foram testados isoladamente em cepas de *C*. *albicans*, demonstrando valores de CIM de 0.5% para ambos e CFM de 1% e 2%, respectivamente (Jiang *et al*., 2011). Embora estudos tenham demonstrado outros compostos majoritários em óleos essenciais de *R*. *officinalis* L., como cânfora, verbenona, acetato de bornila e mirceno (Angioni *et al*., 2004; Santoyo *et al*., 2005; Prins *et al*., 2006; Cleff *et al*., 2012), essas substâncias também podem ser responsáveis por propriedades antimicrobianas.

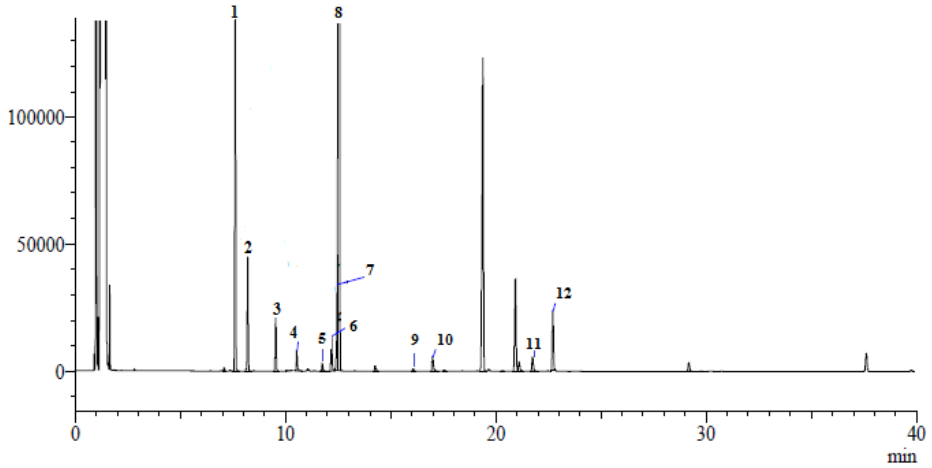

Figura 3. Constituintes identificados no óleo essencial extraído de partes aéreas de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografia gasosa (CG-FID): α-pineno (1), canfeno (2), β-pineno (3), mirceno (4), α-terpineno (5), p-cimeno (6), limoneno (7), 1,8-cineol (8), terpinoleno (9), linalool (10), terpinen-4-ol (11), α-terpineol (12).

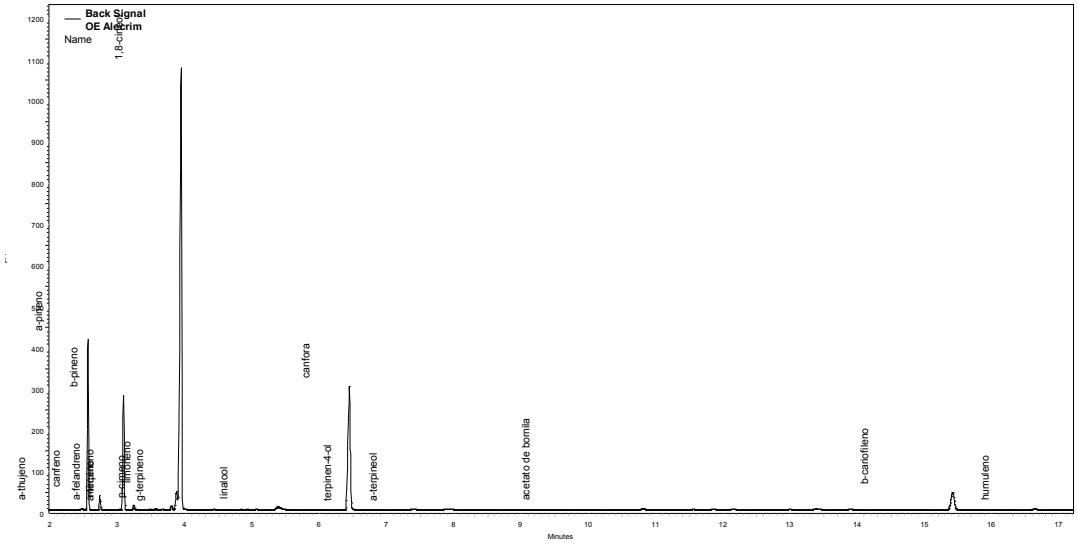

Figura 4. Constituintes identificados no óleo essencial comercial de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografia gasosa de alta resolução (CG-FID): α-thujeno, α-pineno, canfeno, β-pineno, mirceno, α-felandreno, α-terpineno, p-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, γ-terpineno, linalool, cânfora, terpinen-4-ol, α-terpineol, acetato de bornila, α-copaeno, β-cariofileno, humuleno e outros constituintes.

Sabe-se que a atividade antifúngica dos óleos essenciais das plantas da família Lamiaceae está atribuída a diversas substâncias químicas responsáveis pela proteção das plantas contra patógenos microbianos (Chami *et al*., 2004; Singh *et al*., 2012; Maida *et al*., 2014). Nos diversos estudos, observa-se que as concentrações antifúngicas dos óleos

essenciais são distintas, o que pode ser explicada pela suscetibilidade dos diferentes patógenos, assim como pela composição química dos óleos testados. Nossos dados revelaram semelhança na composição química dos óleos extraídos e comerciais das plantas, embora a composição majoritária do *O. vulgare* L. tenha diferido. Essa diferença é influenciada pelos fatores relacionados ao cultivo da planta, tais como tipo de clima, sazonalidade, área geográfica, condição de cultura, bem como pela técnica de obtenção dos seus óleos, condições de secagem e armazenamento, etc. (Simões *et al*., 2003; Prins *et al*., 2006; Cernicka & Subik, 2007).

No presente estudo, a técnica de obtenção foi similar para a extração dos produtos, no entanto, a origem das plantas se diferenciaram, pois os óleos comerciais apresentavam origem da Moldávia (Leste Europeu) para orégano e Tunísia (África) para alecrim, ao passo que os óleos foram extraídos de partes aéreas de ambas plantas coletadas no Chile (América do Sul). Embora todos os isolados de *Sporothrix* spp. tenham sido sensíveis a todos os produtos testados, a variação nos resultados de CIM e CFM entre os óleos das mesmas plantas pode ter sido influenciado pela diferente origem de cultivo botânico.

Além disso, a menor atividade anti-*Sporothrix* spp. atribuída ao óleo comercial de *O. vulgare* L. em relação ao extraído de partes aéreas pode ser influenciada pela qualidade do produto, pois os mesmos podem apresentar adulterações que comprometam a sua composição química e, consequentemente, a eficiência terapêutica, tais como adição de compostos de baixo valor financeiro e mistura de óleos voláteis de diferentes qualidade para proporcionar maior rendimento (Simões & Spitzer, 2003; Veigar Jr. *et al*., 2005).

Embora os mecanismos de ação dos compostos químicos sobre os microorganismos não esteja elucidada, autores citam que os óleos essenciais possam provocar danos às enzimas responsáveis pela produção de energia e síntese de compostos estruturais

(Lambert *et al*., 2001). Ainda, sensibilizariam a camada fosfolipídica da membrana celular dos microorganismos, aumentando a permeabilidade e provocando perda de componentes intracelulares (Cox *et al*., 2000; Ultee & Smid, 2001), ou danificariam a membrana plasmática, reduzindo a produção do ergosterol fúngico (Pinto *et al*., 2006).

CONCLUSÕES

A atividade antifúngica *in vitro* foi similar entre os óleos essenciais de diferentes origens de *R*. *officinalis* L. e *O*. *vulgare* L. frente a todos os isolados clínicos de *Sporothrix* spp., inclusive sobre os resistentes ao itraconazol. Em *O*. *vulgare* L., o produto comercial apresentou menor atividade antifúngica em relação ao extraído, devido à diferença na constituição química majoritária, o que não foi observado em *R*. *officinalis* L. A boa atividade anti-*Sporothrix* spp. dos óleos essenciais de *R*. *officinalis* L. e *O*. *vulgare* L. é promissora para o tratamento da esporotricose, o qual requer maiores estudos científicos.

CONFLITO DE INTERESSES

Os autores declaram não existir conflitos de interesse para publicação deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

Angioni A, Barra A, Cereti E, Barile D, Coïsson JD, Arlorio M, Dessi S, Coroneo V, Cabras P (2004). Chemical composition, plant genetic differences, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. *J Agric Food Chem*. 52:3530-3535.

Baydar H, Sagdic O, Ozkan G (2004). Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control*. 15:169-172.

149 Borges TS (2007). Isolamento de *Sporothrix schenckii* de garras de felinos domésticos
150 (domicialiados e querenciados) e daqueles mantidos em cativeiro, em São Paulo
151 (Brasil). São Paulo, Brasil, 69p. (M. Sc. Dissertation. Universidade de São Paulo, USP).

152 Bozin B, Mimica-Dukin N, Samojlik I, Jovin E (2007). Antimicrobial and antioxidant
153 properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L.,
154 Lamiaceae) Essential Oils. *J Agric Food Chem*. 55:7879-7885.

155 Cernicka J, Subik J (2006). Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida*
156 *albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int J Antimicrob Ag*. 27:403-408.

157 Chami N, Chami F, Bennis S, Trouillas J, Remmal A (2004). Antifungal treatment with
158 carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosupressed rats. *Braz J Infect Dis*.
159 8:217-226.

160 Chattopadhyay D, Chawla-Sarkar M, Chatterjee T, Sharma Dey R, Bag P, Chakraborti
161 S, Khan MT (2009). Recent advancements for the evaluation of anti-viral activities of
162 natural products. *N Biotechnol*. 25(5):348–365.

163 Cleff MB, Madrid IM, Meinerz AR, Meireles MCA, Mello JRB, Rodrigues MR,
164 Escareño JJH (2013). Essential oils against *Candida* spp: *in vitro* antifungal activity of
165 *Origanum vulgare*. *Afr J Microbiol Res*. 7 (20):2245-2250.

166 Cleff MB, Meinerz ARM, Madrid I, Fonseca AO, Alves GH, Meireles MCA, Rodrigues
167 MRA (2012). Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de
168 animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Rev Bras Plantas Med*. 14(1):43-
169 49.

170 Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, Rodrigues MR,
171 Meireles MCA (2010). Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de
172 importância médica e veterinária. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 62(5):1291-1294.

173 Cleff MB, Meinerz ARM, Schuch LFD, Rodrigues MRA, Meireles MCA, Mello JRB
174 (2008). Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix*
175 *schenckii*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 60(2):513-516.

176 CLSI: Clinical and Laboratory Standards Institute (2008). Reference Method for Broth
177 Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27-A3 Guideline. Approved
178 Standard – 3th Edition.

179 Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllie SG
180 (2000). The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*
181 (tea tree oil). *J Appl Microbiol*. 88(1):170-175.

182 Farmacopéia Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, Parte I, 1988.

183 Cruz LCH (2011). Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte de literatura e
184 considerações sobre diagnóstico e a epidemiologia. *Vet Zootec*. 20:8-28.

185 Ellis D (2002). Amphotericin B: spectrum and resistance. *J Antimicrob Chemother*.
186 49(S1):7-10.

187 Galuppi RS, Aureli C, Bonoli F, Ostanello F, Gubellini E, Tampiere MP (2010).
188 Effectiveness of essential oils against *Malassezia* spp.: comparison of two *in vitro* test.
189 *Mikel Lek*. 17(2):79-84.

190 Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Mikail C, Abou L, Portugal H (2004). Antifungal
191 effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal
192 action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. *Phytother Res*.
193 18(12)?990-995.

194 Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YG, Liu XL (2011). Chemical
195 composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ Toxicol*
196 *Pharmacol*. 32:63-68.

197 Kabouche Z, Boutaghane N, Laggoune S, Kabouche A, Ait-Kaki Z, Benlabed K
198 (2005). Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria.
199 *Int J Aromather*. 15(3):129-33.

200 Kohler LM, Monteiro PCF, Hahn RC, Hamdan JS (2004). *In Vitro* Susceptibilities of
201 Isolates of *Sporothrix schenckii* to Itraconazole and Terbinafine. *J Clin Microbiol*.
202 42(9):4319-4320.

203 Lambert RJW, Skandamis PN, Coote PJ (2001). A study of the minimum inhibitory
204 concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl*
205 *Microbiol*. 91(3):453-462.

206 Larsson CE (2011). Esporotricose. *Braz J Ve*. *Res Anim Sci*. 48(3):250-259.

207 Luqman S, Dwivedi GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS (2007). Potential of
208 Rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Altern Ther Health Med*. 13(5):54–
209 59.

210 Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Nobre MO, Meireles MCA (2011).
211 Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis - A Description
212 of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*. 173: 265-273.

213 Madrid IM, Mattei A, Martins A, Nobre M, Meireles M (2010). Feline sporotrichosis in
214 the southern region of Rio Grande do Sul, Brazil: clinical, zoonotic and therapeutic
215 aspects. *Zoonoses Public Health*. 57: 151-154.

216 Maida I, Lo Nostro A, Pesavento G, Barnabei M, Calonico C, Perrin E, Chiellini C,
217 Fondi M, Mengoni A, Maggini V, Vannacci A, Gallo E, Bilia A, Flamini G, Gori L,
218 Firenzuoli F, Fani R (2014). Exploring the Anti-*Burkholderia cepacia* Complex
219 Activity of Essential Oils: A Preliminary Analysis. *Evid Based Complement Alternat*
220 *Med*. Article ID 573518, 10 pages.

221 Manohar V, Ingram C, Gray J, Talpur NA, Bagghi D, Preuss HG (2001). Antifungal
222 activities of origanum oil against *Candida albicans*. *Mol Cell Biochem*. 228:111-117.

223 Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J (2007). *Sporothrix*
224 *brasiliensis, S*. *globosa* and *S*. *mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical
225 interest. *J Clin Microbiol*. 45:3198–3206.

Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J (2008). *In vitro* Antifungal Susceptibilities of Five Species of *Sporothrix*. *Antimicrob AgentsChemother*. 52:732-734.

Odds FC, Brown AJP, Gow NAR (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *TRENDS Microbiol*. 11(6):272-279.

Packer JF, Luz MMS (2009). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Rev Bras Farmacogn*. 17(1):102-107.

Pereira SA, Passos SRL, Silva JN, Gremião IDF, Figueiredo FB, Teixeira JL, Monteiro OC, Schubach TMP (2010). Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. *Vet Rec*. 166: 290-294

Pinto E, Pina-Vaz C, Salgueiro L, Gon;alves MJ, Costa-de-Oliveira S, Cavaleiro C, Palmeira A, Rodrigues A, Martinez-de-Oliveira J (2006). Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida, Aspergillus* and dermatophyte species. *J Med Microbiol*. 55(10):1367-1373.

Prins CL, Lemos CLS, Freitas SP (2006). Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Rev Bras Plantas Med*. 8(4): 92-95.

Rodrigues AM, de Hoog GS, Zhang Y, Camargo ZP (2014). Emerging sporotrichosis in driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg Microbes Infect*. 3:e32.

Rodrigues AM, de Melo TM, de Hoog GS, Schubach TMP, Pereira AS, Fernandes GF, Bezerra LML, Felipe MS, de Camargo ZP (2013). Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. *Plos Negl Trop Dis*. 7:e2281.

Saeed S, Tariq P (2009). Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. *Pak J Pharm Sci*. 22(4): 421-424.

Santin R (2013). Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae. Porto Alegre, Brasil, 106p. (D.Sc. Thesis. Instituto de Ciências Básica da Saúde, UFRGS).

Santin R, Giordani C, Madrid IM, Matos CB, Freitag RA, Meireles MCA, Cleff MB, Mello JRB (2014). Antifungal activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Malassezia pachydermatis*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 66(2): 367-373.

Santoyo S, Cavero S, Jaime L, Ibanez E, Senorans FJ, Reglero G (2005). Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. *J Food Prot*. 68(4): 790–795.

Schubach TMP, Schubach A, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FF, Cuzzi-Maya T, Filho-Monteiro PC, Perez RS, Wanke B (2004). Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). *J Am Vet Med Assoc*. 224:1623-1629.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (2003). Farmacognosia. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC.

265 Singh D, Kumar TRS, Gupta VK, Chaturvedi P (2012). Antimicrobial activity of some
266 promising plant oils, molecules and formulation. *Indian J Exp Biol*. 50:714-717.

267 Souza NAB, Lima EO, Guedes DN, Pereira FO, Souza EL, Sousa FB (2010). Efficacy
268 of *Origanum* essential oils for inhibition of pottentially pathogenic fungi. *Braz J Pharm*
269 *Sci*. 46(3): 499-508.

270 Ultee A, Smid EJ (2001). Influence of carvacrol on groth and toxin production by
271 *Bacillus cereus*. *Int J Food Microbiol*. 64:373-378.

272 Vale-Silva L, Silva MJ, Oliveira D, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, Pinto E
273 (2012). Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum*
274 *vulgare* subsp. *Virens* with their *in vitro* activity against pathogenic yeasts and
275 filamentous fungi. *J Med Microbiol*. 61: 252-260.

276 Veiga Jr. VF, Pinto AC, Maciel MAM (2005). Plantas Medicinais: Cura Segura? *Quim*
277 *Nova*. 28(3): 519-528.

278 Xavier MO, Nobre MO, Sampaio Jr. DP, Antunes TA, Nascente PS, Sória FBA,
279 Meireles MCA (2004). Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de
280 Pelotas, RS, Brasil. *Ciênc Rural*. 34(6): 1961-1963.

4.2 ARTIGO 2

Sensibilidade de Fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* à Manjerona (*Origanum majorana* L.)

Stefanie Bressan Waller; Isabel Martins Madrid; Vanny Ferraz; Tony Picoli; Marlete Brum Cleff; Mário Carlos Araújo Meireles; João Roberto Braga de Mello

Artigo formatado sobre normas da Revista *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*

Sensibilidade de Fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* à Manjerona (*Origanum majorana* L.)

Stefanie B WALLER[1*], Isabel M MADRID[2], Vanny FERRAZ[3], Tony PICOLI[4], Marlete B CLEFF[5], Mário C A MEIRELES[6], João R B de MELLO[7]

[1] Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.
[2] Prefeitura Municipal de Pelotas, Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Pelotas-RS, Brasil.
[3] Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química, Universidade Federal de Minhas Gerais (UFMG), Belo Horizonte-MG, Brasil.
[4] Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[5] Departamento de Clínicas Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[6] Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[7] Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.

Contatos: Stefanie B WALLER – *E-mail*: waller.stefanie@yahoo.com.br

Resumo: O estudo objetivou avaliar pela primeira vez a atividade anti-*Sporothrix* spp. do óleo essencial de *O. majorana* L., bem como a análise química e atividade citotóxica em células mamíferas deste produto. Isolados fúngicos do Complexo *Sporothrix* de humanos, caninos, felinos e ambiental (*n*: 26), incluindo isolados resistentes ao itraconazol, foram testados através da técnica de Microdiluição em Caldo (CLSI M27-A3). Todos os isolados foram sensíveis, com CIM entre ≤2.25 a 9 mg/mL e CFM entre ≤2.25 a 18 mg/mL. Itraconazol foi efetivo para a maioria dos isolados nas CIM/CFM de ≤0.03 a 16 μg/mL, porém, um isolado canino e seis felinos foram resistentes à máxima concentração testada. Vinte e dois compostos químicos foram identificados através de cromatografia gasosa de alta resolução (CГ-FID), sendo 1,8-cineol e 4-terpineol as substâncias majoritárias. A toxicidade foi observada entre 70% a 80% das células mamíferas para todas as concentrações testadas, sendo a concentração do óleo essencial diretamente proporcional ao potencial citotóxico. O estudo demonstrou a atividade satisfatória *in vitro* do óleo de *O. majorana* L. sobre isolados de *Sporothrix* spp., sendo promissor o seu uso no tratamento da esporotricose, no entanto, mais estudos devem ser conduzidos para o seu uso seguro e eficaz contra a doença.

Palavras-chave: esporotricose; manjerona; fitoterápico; resistência antifúngica.

INTRODUÇÃO

Planta aromática pertencente à família Lamiaceae, a manjerona (*Origanum majorana* Linn., sinônimo de *Majorana hortensis* L.) é nativa do Mediterrâneo oriental e Chipre e apresenta folhas altamente aromáticas, que podem ser utilizadas frescas ou secas. A planta é largamente utilizada como flavorizante e condimento em alimentos, sendo o óleo essencial e diferentes extratos aplicados em produtos farmacêuticos, cosméticos e em perfumarias (Vera & Chane-Ming, 1999). Em medicina popular, a manjerona é utilizada contra asma, indigestão, cólicas, dores de cabeça, tonturas, enxaqueca, depressão e reumatismo, tendo atividade diurética (Van Den Broucke & Lemli, 1980; Jun et al., 2001).

A atividade antibacteriana, antifúngica, antiviral e inseticida está atribuída ao seu óleo essencial, principalmente aos compostos timol e carvacrol, e apresenta grande potencial para uso em aplicações industriais (Daferera *et al*., 2000; Nostro *et al*., 2004). O forte potencial antioxidante é atribuído ao elevado conteúdo de flavonóides e ácidos fenólicos, os quais são utilizados na preservação de alimentos (Vági *et al*., 2005). Ainda, tem sido relatada seu efeito renal e hepatoprotetor (El-Ashmawy *et al*., 2005).

As propriedades antimicrobianas da manjerona têm sido comprovadas (Daferera *et al*., 2000; Ezzedine *et al*., 2001; Vági *et al*., 2005), incluindo diversos fungos patogênicos de interesse médico humano e médico veterinário, tais como *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Trichophyton* spp., *Microsporum* spp., *Malassezia* spp. e *Trichosporon* spp. (Daferera *et al*., 2000; Busatta *et al*., 2008; Souza, 2010; Santin, 2013), com atividade promissora em enfermidades fúngicas, incluindo aquelas com potencial zoonótico.

Neste sentido, destaca-se a esporotricose, uma micose zoonótica de ocorrência mundial frequente em humanos e animais no Brasil (Madrid *et al*., 2012; Silva *et al*., 2012). Essa infecção é transmitida através da inoculação traumática na pele de conídios fúngicos do Complexo *Sporothrix schenckii* (Marimon *et al*., 2006; Marimon *et al*., 2008) e lesões limitadas ao tecido cutâneo e subcutâneo podem surgir no hospedeiro, podendo ter envolvimento linfático e manifestações clínicas sistêmicas (Larsson *et al*., 2011). O tratamento de eleição é realizado com o fármaco antifúngico itraconazol (Honse *et al*., 2010; Madrid *et al*., 2010; Rodrigues *et al*., 2014), entretanto o surgimento de cepas resistentes tem sido observado (Kontoyiannis & Lewis, 2002; Gutierrez-Galhardo *et al*., 2010; Rodrigues *et al*., 2014).

Atualmente, a busca por novos compostos químicos com atividade anti-*Sporothrix* spp. através de plantas medicinais está em ascensão, porém, os estudos ainda são escassos (Cleff *et al*., 2008; Gaitán *et al*., 2011), não havendo estudos da atividade de *O*. *majorana* L. contra a

isolados de esporotricose. Este trabalho objetivou avaliar a eficácia *in vitro* do óleo essencial de *O*. *majorana* L. contra isolados clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii* de humanos e animais com esporotricose, incluindo isolados resistentes ao itraconazol, e avaliar a citotoxicidade celular.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Botânico

Óleo essencial de *Origanum majorana* L. foi adquirido comercialmente (Ferquima® - Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista/SP, Brasil), com certificação botânica e de origem do Egito.

Análise Química

A análise química foi realizada através da cromatografia gasosa de alta resolução (CГ-FID) em cromatógrafo gasoso HP 7820A (Agilent®) equipada com coluna HP-5 (30m x 0.32 mm x 0.25 mM – Agilent®) a uma temperatura inicial de 70°C, com adição de 3ºC por minuto até atingir 240ºC. A temperatura do injetor foi de 250ºC; do detector FID, 260ºC; arraste com hidrogênio de 3 mL/minuto; e split de 1:30 com gas. Solução do óleo essencial de *O*. *majorana* L. foi diluída em clorofórmio a 1% e injetada no cromatógrafo ao volume de 1 μL. Os dados foram adquiridos através do programa EZChrom Elite Compact® (Agilent).

Teste de Citotoxicidade

Os efeitos citotóxicos foram estimados através do ensaio MTT. Células VERO crescidas em meio RPMI-1640 suplementada com L-glutamina e isento de bicarbonato de sódio (pH 7.2) foram adicionadas com penicilina-estreptomicina e anfotericina B à atmosfera úmida de CO_2 a 5% à temperatura de 37ºC. Após crescimento celular, foi adicionada tripsina ao cultivo, e as células foram ressuspensas em RMPI-1640, resultando em aproximadamente $2x10^5$ células/mL. Alíquotas das suspensões celulares foram transferidas para poços individuais de microplaca de 96 poços, exceto no primeiro poço. As células foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementada de soro fetal bovino a 10% em CO_2 a 5% por 24 horas à 37ºC. Subsequentemente, 100 μL de cada óleo, em concentraçãoes sucessivas em escala logarítmica, foram adicionadas às microplacas. Concentrações de 5 a 0.078 mg/mL dos óleos diluídos em RPMI-1640 foram testados em triplicata por 48 horas a 37ºC em atmosfera úmida de CO_2 a 5%. Ao controle negativo, utilizou-se somente RPMI-1640. Para avaliação do resultado, 50 μL de solução de MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide* – (2.5 mg/mL) foi

adicionada em cada poço e a microplaca foi incubada por 2 horas e 30 minutos a 37ºC em atmosfera úmida de CO_2 a 5%. Após remover a solução MTT, 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionada em cada poço, sendo agitado gentilmente por 5 minutos. As amostras foram mensuradas em uma leitora de microplaca em espectofotômetro de comprimento de onda de 540 nm. Com auxílio de microscópio invertido, foi avaliada a aparência das células. Os resultados foram expressos por porcentagem de inibição relativa ao controle de células, considerado este 100%.

Microrganismos Fúngicos

Isolados clínicos do Complexo *Sporothrix* oriundos de humanos (*n:* 5), caninos (*n:* 6) e felinos (*n*: 13) com esporotricose e estocados na micoteca do Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil), foram utilizados para os testes, assim como a cepa padrão IOC 1226 de *Sporothrix schenckii* (*n*: 1) e um isolado de solo ambiental (*n*: 1), totalizando vinte e seis isolados do Complexo *Sporothrix schenckii* testados. O isolamento fúngico ocorreu a partir da semeadura de amostras de lesões suspeitas em placas duplicatas de ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) acrescido de Cloranfenicol e em ágar Mycosel® (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e estocadas a 27ºC e 35ºC para confirmação do dimorfismo típico. Todos os isolados clínicos foram identificados quanto às características macromorfológicas e micromorfológicas a partir de exame direto das colônias em azul-de-lactofenol para a fase filamentosa e através da técnica de Gram para a fase leveduriforme. Os isolados clínicos encontram-se estocados na sua fase filamentosa em tubos estéreis contendo ágar batata-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e refrigerados em temperatura média de 4ºC.

Testes de Suscetibilidade Antifúngica

Os testes de suscetibilidade antifúngica foram realizados através da técnica de Microdiluição em Caldo, segundo o documento M27-A3 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), sendo testada a forma leveduriforme do fungo. Subculturas em ágar Brain-Heart-Infusion (BHI, Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) a 35ºC durante 48 horas foram realizadas, e uma alçada de cada colônia fúngica foi transferida para tubos individuais contendo solução salina estéril e ajustados na escala Mc Farland 1.0 e em espectofotômetro visível a UV (Spectrum Instruments Co., Shanghai, China) na transmitância de 530 nm e absorbância de 80–82%. As suspensões foram ajustadas em solução salina (1:100) e, posteriormente, em meio RPMI-1640 (Sigma, Steinhiem, Alemanha) com MOPS (1:20) para obtenção do inóculo final a $5x10^4$ CFU/mL. Em microplaca de 96 poços de fundo chato, 100 µL de RPMI-1640 com MOPS foram adicionados em cada poço, seguido de 100 µL do óleo essencial de *O*. *majorana* L. contendo 1% de Tween

80, sendo realizada diluições seriadas de 72 a 2.25 mg/mL. Em seguida, 100 µL dos inóculos foram adicionados em todos os poços, exceto no controle negativo, o qual foi adicionado 100 µL do óleo essencial para confirmar sua esterilidade. Itraconazol foi utilizado como controle positivo e foi preparado em dimetilsulfóxido (DMSO), sendo diluído em meio RPMI-1640 contendo MOPS para obtenção das concentrações finais de 16 a 0.0313 µg/mL. As microplacas foram incubadas a 35ºC por 72 horas, e os valores da CIM foram determinadas pela comparação visual com o controle negativo, sendo definidas como a menor concentração do produto testado a inibir o crescimento visível do fungo. Para determinar a CFM, alíquotas de 10 µL de todos os poços a partir da CIM foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e incubadas a 35ºC por 72 horas para visualizar o crescimento fúngico. A CFM foi determinada como a menor concentração capaz de impedir o crescimento fúngico. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Análise Estatística

A análise estatística foram realizados através da análise de variância e comparação das médias geométricas dos dados de acordo com o teste de Tukey através do *software* estatístico BioEstat® na versão 5.3 e o valor $p<0.05$ considerado de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo os resultados da atividade anti-*Sporothrix* spp. do óleo essencial de *O. majorana* L. e do itraconazol (Tabela 1), não houve diferença significativa entre os resultados ($p>0.05$). Todos os isolados clínicos testados foram suscetíveis ao óleo essencial de manjerona, incluindo cepa padrão, e a atividade fungistática foi observada nas concentrações de ≤2.25 a 9 mg/mL, ao passo que a atividade fungicida ocorreu entre ≤2.25 a 18 mg/mL. O óleo essencial apresentou CIM em 96% (25/26) e CFM em 76.9% (20/26) sobre os isolados testados na concentração menor ou igual a 4.5 mg/mL

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *Origanum majorana* L. e do itraconazol sobre isolados clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii*.

Origem do isolados do Complexo *Sporothrix schenckii*		*Origanum majorana* L. (mg/mL)		Itraconazol (μg/mL)	
		CIM	CFM	CIM	CFM
Humana (*n*: 5)	Variação	≤2.25 – 4.5	≤2.25 – 4.5	≤0.03 – 0.5	≤0.03 – 0.5
	50%	≤2.25	4.5	0.5	0.5
	90%	4.5	4.5	0.5	1
Canina (*n*: 6)	Variação	≤2.25 – 4.5	≤2.25 – 18	0.5 – 8	1 – >16
	50%	≤2.25	4.5	1	2
	90%	≤2.25	9	2	16
Felina (*n*: 13)	Variação	≤2.25 – 9	≤2.25 – 9	≤0.03 – >16	0.25 – >16
	50%	4.5	4.5	2	16
	90%	4.5	9	16	>16
Ambiental (*n*: 1)	Variação	≤2.25	≤2.25	0.5	0.5
IOC 1226 (*n*: 1)	Variação	≤2.25	≤2.25	1	8
Todos (*n*: 26)	Variação	≤2.25 – 9	≤2.25 – 18	≤0.03 – >16	≤0.03 – >16
	50%	≤2.25	4.5	2	2
	90%	4.5	9	8	>16

50% e 90% referem-se à porcentagem em relação ao total de isolados testados.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de manjerona já foi descrita contra agentes patogênicos, cujos estudos estão concentrados em bactérias, como *Staphylococcus aureus*, *S. coagulase* negativa, *Streptococcus pyogenes*, *Enterobacter* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, entre outras (Busatta *et al*., 2008; Oliveira *et al*., 2009; Sfeir *et al*., 2013). Embora a falta de padronização nos testes *in vitro* envolvendo plantas medicinais dificulte a comparação dos resultados antimicrobianos, escassos estudos com *O. majorana* L. como antifúngico têm demonstrado sua atividade promissora, por ter inibido a germinação de conídios de *Penicillium digitatum* à 250 μg/mL (Daferera *et al*., 2000) e inibido o crescimento de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum gypseum* e *Aspergillus flavus* à 160 μL/mL (Souza, 2010). Santin (2013) demonstrou que o óleo essencial de manjerona apresentou atividade nas CIM e CFM entre ≤1.87 a 30 mg/mL contra *Malassezia pachydermatis*, *C. albicans*, *C. famata*, *C. parapsilosis* e *Trichosporon asahii*, resultados que se assemelham aos do presente estudo, visto que os isolados de *Sporothrix* spp. foram sensíveis entre ≤2.25 a 18 mg/mL.

Itraconazol apresentou atividade nas CIM e CFM entre ≤0.03 a >16 μg/mL, sendo a CIM_{90} dos isolados felinos maior que 16 μg/mL, valor este superior aos dos isolados caninos (2 μg/mL) e humanos (0.5 μg/mL). Sabe-se que a espécie felina apresenta elevada incidência de

esporotricose no Brasil, especialmente nas regiões Sudeste e Sul (Schubach et al., 2004; Madrid *et al*., 2010; Madrid *et al*., 2012). Infelizmente, as irregularidades no manejo terapêutico pelos proprietários dos animais é comum e ocorre devido às dificuldades na administração oral, bem como ao custo elevado dos antifúngicos, culminando no abandono da terapia, principalmente quando ocorre melhora das lesões cutâneas nos animais (Chaves *et al*., 2013). Esses fatores favorecem o surgimento de cepas resistentes, os quais dependem, em geral, de maiores concentrações dos antifúngicos para o controle da esporotricose, como observado nos presentes resultados. Em humanos, o surgimento de cepas resistentes já foi relatado (Kohler *et al*., 2004), entretanto, essa ocorrência é menor em comparação aos casos em animais, devido provavelmente aos maiores cuidados durante a terapia e do ser humano em relação à própria saúde (Kauffman *et al*., 2007; Yamada *et al*., 2011).

De maneira geral, observou-se uma fraca atividade fungicida do itraconazol sobre os isolados testados (CFM_{90}>16 μg/mL), sendo observado resistência antifúngica ao itraconazol em seis isolados clínicos de felinos e um de canino (CFM>16 μg/mL). Essa resistência antifúngica também foi demonstrado por Rodrigues *et al*. (2014) sobre cepas de *S*. *schenckii, S*. *brasiliensis, S*. *globosa* e *S*. *mexicana*, os quais alertam sobre essa problemática em saúde pública. Interessantemente, os mesmos isolados resistentes apresentaram sensibilidade ao óleo essencial de *O*. *majorana* L. nas concentrações iguais ou inferiores a 9 mg/mL, atribuindo esta planta como promissora para maiores estudos visando o tratamento da esporotricose.

De modo similar, cepas de *S*. *schenckii* resistentes ao itraconazol também apresentaram suscetibilidade a extratos de plantas do gênero *Pterocaulon* (Stopiglia et al., 2011). Em plantas da mesma família botânica da manjerona (Lamiaceae), bactérias e leveduras resistentes a antimicrobianos também apresentaram-se sensíveis aos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. (Luqman et al., 2007) e *Origanum vulgare* L. (Maida et al., 2014), demonstrando que, assim como encontrado em *O*. *majorana* L., outras plantas medicinais também apresentam potencial promissor como novos antifúngicos, especialmente nos casos de cepas resistentes a antifúngicos. Diante deste fato, torna-se necessário explorar os estudos em alternativas terapêuticas no tratamento da esporotricose, especialmente com plantas medicinais.

Embora não existam critérios válidos para as concentrações mínimas antifúngicas em testes *in vitro* com extratos de plantas (Stopiglia *et al*., 2011), observa-se que o óleo de manjerona apresentou atividade satisfatória contra *Sporothrix* spp., incluindo sobre fungos resistentes ao itraconazol. À menor concentração (≤2.25 mg/mL), 52% (13/25) e 32% (08/25) dos isolados foram, respectivamente, inibidos e eliminados pelo óleo essencial, devendo-se realizar mais testes para determinar seus valores fungistáticos e fungicidas mínimos. Nas concentrações igual ou inferiores a 9 mg/mL, o uso do óleo essencial foi suficiente para inibir e

eliminar o crescimento de 50% (CIM_{50}/CFM_{50}) e 90% (CIM_{90}/CFM_{90}) dos isolados do Complexo *Sporothrix schenckii* testados.

O teste citotóxico demonstrou que o percentual de toxicidade celular foi entre 70% a 80% em todas as concentrações testadas, e que aumentava conforme o aumento da concentração do óleo essencial em proporção direta (Figura 1). Entretanto, salienta-se que nosso estudos foram realizados *in vitro* e que, segundo Nogueira & Andrade (2011), as células mamíferas em testes MTT são mais suscetíveis em comparação aos testes *in vivo*, devido à exposição direta do produto, ao passo que *in vivo*, o produto sofre influência de diversas ações externas, como influência do pH gástrico e metabolização hepática renal, entre outras. Erdoğan *et al*. (2012) demonstraram que a concentração máxima não-tóxica do óleo essencial de *O*. *majorana* L. sobre células VERO foi de 3.2 µg/mL. Para o promissor uso da manjerona na tratamento da esporotricose, a atividade citotóxica foi realizada conforme os resultados da CIM e CFM, sendo este estudo preliminar de triagem e não apresenta definição de toxicidade para o produto testado. Maiores estudos em relação aos efeitos tóxicos devem ser conduzidos, inclusive *in vivo*, a fim de se avaliar a influência da dose e da via de administração em pacientes acometidos pela doença. Veiga Jr. *et al*. (2005) citam que o grau de toxicidade do fitoterápico é dependente de diversos fatores, como a dose utilizada e a frequência de administração, e que baixas dosagens podem provocar intoxicação alérgicas em pacientes sensíveis e irritações cutâneas (Baričevič & Bartol, 2002; Lorenzi & Matos, 2006).

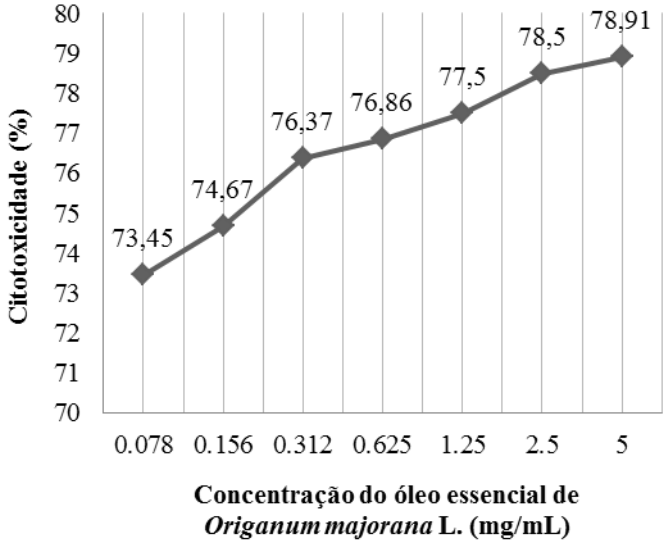

Figura 1. Percentual de citotoxicidade (%) em células VERO testadas em ensaio MTT sobre o óleo essencial de *Origanum majorana* L. nas concentrações de 0.078 a 5 mg/mL

A análise química demonstrou que 1,8-cineol e 4-terpineol foram os compostos majoritários, seguido de γ-terpineno, *p*-cimeno, sabineno e outros (Figura 2; Tabela 2). Os compostos químicos encontrados foram similares aos descritos científicos (Marino *et al*. 2001; Burt & Reinders, 2004; Vági *et al*., 2005; Busatta *et al*., 2008; Santin, 2013; Sfeir *et al*., 2013), porém, os constituintes majoritários diferiram dos achados de Marino *et al*. (2001), a qual timol e carvacrol foram prevalentes. Sabe-se que a presença de compostos fenólicos em plantas está altamente relacionada às propriedades antimicrobianas (Ferrara *et al*., 2003; Sfeir *et al*., 2013), os quais provocam aumento da permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, destruindo sua estrutura física (Ultee & Smid, 2001). Entretanto, Souza (2010) sugeriu que o óleo essencial de manjerona atua como inibidor da parede celular do microorganismo, embora outros mecanismos que expressam sua atividade antimicrobiana possam estar envolvidos.

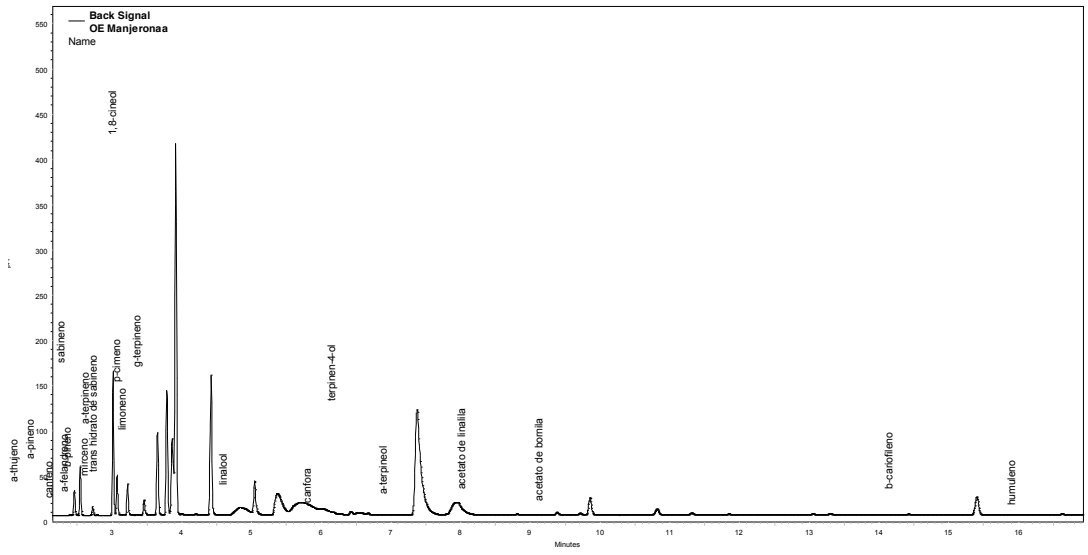

Figura 2. Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Origanum majorana* L. através da cromatografia gasosa de alta resolução por tempo de retenção em minutos (CG-FID).

Tabela 2. Constituintes químicos encontrados no óleo essencial de *Origanum majorana* L.

Pico	Constituinte	IR calculado	Área	Concentração (%)
1	α-thujeno	932	281814	1.1
2	α-pineno	932	494138	2.0
3	canfeno	941	96074	0.4
4	sabineno	946	1669329	6.7
5	β-pineno	975	470225	1.9
6	mirceno	984	408894	1.6
7	α-felandreno	1003	226808	0.9
8	α-terpineno	1015	1152102	4.6
9	p-cimeno	1019	1755163	7.0
10	limoneno	1023	1316921	5.3
11	1,8-cineol	1027	5222929	20.9
12	β-ocimeno	1056	34661	0.1
13	γ-terpineno	1089	2130943	8.5
14	trans hidrato sabineno	1094	564967	2.3
15	linalool	1099	1096294	4.4
16	canfora	1142	48346	0.2
17	terpinen-4-ol	1175	5100062	20.4
18	α-terpineol	1188	1162894	4.7
19	acetato de linalila	1261	438735	1.8
20	acetato de bornila	1285	212333	0.8
21	β-cariofileno	1421	546553	2.2
22	humuleno	1453	41993	0.2
23	outros		517426	2.1

IR – Índice de Retenção

CONCLUSÕES

A boa atividade fungistática e fungicida do óleo essencial de *O. majorana* L. sobre *Sporothrix* spp., inclusive sobre isolados resistentes ao itraconazol, incentiva maiores pesquisas antifúngicas com esta promissora planta. Dentre os compostos identificados, 1,8-cineol e terpinen-4-ol foram majoritários. Embora o óleo de *O. majorana* L. tenha apresentado toxicidade celular entre 70% a 80%, estudos *in vivo* devem ser conduzidos para o conhecimento de seu uso seguro, inclusive na esporotricose experiental.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, CAPES e FAPERGS pelo suporte financeiro.

BIBLIOGRAFIA

Baričevič D, Bartol T. 2002. The biological/pharmacological activity of the oregano genus. pp.177-214. In: Kintzios S. (ed) Oregano: the genera Origanum and Lippia, Medicinal and aromatic plants – industrial profiles. Taylor & Francis, London, England.

Burt SA, Reinders RD. 2004. Antibacterial activity of selected plant essential oils agains *Escherichia coli* O157:H7. ***Lett Appl Microbiol*** 36: 162-167.

Busatta C, Vidal RS, Popiolski AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MRA, Corazza FC, Corazza ML, Vladimir Oliveira J, Cansian RL. 2008. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as na antimicrobial agent in sausage. ***Food Microbiol*** 25: 207-211.

Chaves AR, Campos MP, Barros MBL, Carmo CN, Gremião IDF, Pereira SA, Schubach TMP. 2013. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis – Study of 147 Cases. ***Zoonoses Public Health*** 60: 149-153.

Cleff MB, Meinerz ARM, Schuch LFD, Rodrigues MRA, Meireles MCA, Mello JRB. 2008. *In vitro* Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare* against *Sporothrix schenckii*. ***Arq Bras Med Vet Zootec*** 60(2): 513-516.

Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. 2000. GC–MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. ***J Agric Food Chem*** 48: 2576–2581.

El-Ashmawy IM, El-Nahas AF, Salama OM. 2005. Protective effect of volative oil, alcoholic and aqueous extracts of *Origanum majorana* on lead acetate toxicity in mice. ***Basic Clin Pharm Toxicol*** 97: 238-243.

Erdoğan IO, Ozcelik B, Kartal M, Kan Y. 2012. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. ***Turk J Biol***, 36: 239-246.

Ezzedine NB, Abdelkefi MM, Ben Aissa R, Chaabouni MM. 2001. Antibacterial screening of *Origanum majorana* L., oil from Tunisia. ***J Essent Oil Res***, 13: 295-297.

Ferrara LK, Montesanto D, Chiantese C. 2003.*Origanum marjoran* L. in medicine and foods. ***Ingred Aliment*** 2: 23-25.

Gaitán I, Paz AM, Zacchino SA, Tamayo G, Giménez A, Pinzón R, Cáceres A Gupta MP. 2011. Subcutaneous antifungal screening of Latin American plant extracts against *Sporothrix schenckii* and *Fonsecaea pedrosoi*. ***Pharmaceut Biol*** 49(9): 907-919.

Gutierrez-Galhardo MC, Zancopé-Oliveira RM, Monzón A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2010. Antifungal susceptibility profile *in vitro* of *Sporothrix schenckii* in two growth phases and by two methods: microdilution and E-test. ***Mycoses***. 53(3): 227-231.

Honse CO, Rodrigues AM, Gremião IDF, Pereira AS, Schubach TM. 2010. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. ***Vet Rec*** 166(7): 208-209.

Jun WJ, Han BK, Yu KW, Kim MS, Chang IS, Kim HY, Cho HY. 2001. Antioxidant effects of *Origanum majorana* L. on superoxide anion radicals. ***Food Chem*** 75: 439–444.

Kauffman CA, Bustamante B, Chapman SW, Pappas PG. 2007. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. ***Clin Infect Dis***. 45:1255-1265.

Kohler LM, Monteiro PCF, Hahn RC, Hamdan JS. 2004. *In Vitro* Susceptibilities of Isolates of *Sporothrix schenckii* to Itraconazole and Terbinafine. ***J Clin Microbiol*** 42(9): 4319-4320.

Kontoyiannis DP, Lewis RE. 2002. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. ***Lancet*** 359: 1135-1143.

Larsson CE. 2011. Esporotricose. ***Bra J Vet Res Anim Sci*** 48(3): 250-259.

Lorenzi H, Matos FJ. Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2006. 512p

Luqman S, Dwivedi G R, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS. 2007. Potential of Rosemary oil to be used in drug-resistant infections. ***Altern Ther Health Med*** 13(5): 54–59.

Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Nobre MO, Meireles MCA. 2012. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis/A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. ***Mycopathologia***. 173(4): 265-273.

Madrid IM, Mattei AS, Martins AF, Nobre MO, Meireles MCA. 2010. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. ***Zoonoses Public Health*** 57(2): 151-154.

Maida I, Lo Nostro A, Pesavento G, Barnabei M, Calonico C, Perrin E, Chiellini C, Fondi M, Mengoni A, Maggini V, Vannacci A, Gallo E, Bilia AR, Flamini G, Gori L, Firenzuoli F, Fani R. 2014. Exploring the Anti-*Burkholderia cepacia* Complex Activity of Essential Oils: A Preliminary Analysis. ***Evid Based Complement Alternat Med*** Article ID 573518, 10 pages.

Marimon R, Gené J, Cano J, Trilles L, dos Santos Lazera M, Guarro J. 2006. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. ***J Clin Microbiol*** 44: 3251-3256.

Marimon R, Serena C, Géne J, Cano J, Guarro J. 2008. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix schenckii*. ***Antimicrob Agents Chemother***. 52: 732-734.

Marino M, Bersani C, Comi G. 2001. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. ***Int J Food Microbiol*** 67: 187-195.

Nogueira RMB, Andrade SF. 2011. Manual de Toxicologia Veterinária. Ed. I. Roca, Brasil, 323 p.

Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, Sudano RA, Aloazo V. 2004. Susceptibility of methicillinresistant *Staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. ***FEMS Microbl Let***t 230: 191–195.

Oliveira JLTM, Diniz MFM, Lima EO, Souza EL, Trajano VN, Santos BHC. 2009. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. ***Braz Arch Biol Techn*** 52(1): 45-50.

Rodrigues AM, de Hoog GS, Pires DC, Brilhante RSN, Sidrim JJC, Gadelha MF, Colombo AL, Camargo ZP. 2014. Genetic diversity and antifungal susceptibility profiles in causative agents of sporotrichosis. ***BMC Infect Dis*** 14:219.

Santin R. 2013. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae. 104f. (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre/RS.

Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, Fialho-Monteiro PC, Reis RS, Perez MA, Wanke B. 2004. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998–2001). ***J Am Vet Med Assoc*** 224: 1623-1629.

Sfeir J, Lefrançois C, Baudoux D, Derbré S, Licznar P. 2013. *In vitro* antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. 2013. ***Evid Based Complement Alternat Med*** Article ID 269161, 9 pages.

Silva MBT, Costa MMM, Torres CCS, Galhardo MCG, do Valle ACF, Magalhães MAFM, Sabroza PC, Oliveira RM. 2012. Urban sporotrichosis: a neglected epidemic in Rio de Janeiro, Brazil. ***Cad. Saúde Pública*** 28(10): 1867-1880.

Souza NAB. 2010. Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos. 150f. (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa/PB.

Stopiglia CDO, Vianna DR, Meirelles GC, Teixeira H, Von Poser GL, Scroferneker ML. 2011. Antifungal Activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. ***J Mycol Med*** 21(3): 169-172.

Ultee A, Smid EJ. 2001. Influence of carvacrol on groth and toxin production by *Bacillus cereus*. ***Int J Food Microbiol*** 64: 373-378.

Vági E., Simándi B., Suhajda Á., Héthelyi É. 2005. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. ***Food Res Int***, 38:51-57.

Van Den Broucke CO, Lemli JA. 1980. Antispasmodic activity of *Origanum* compactum. ***Planta Med*** 38: 317–331.

Veiga Jr., V.F., Pinto, A.C.; Maciel, M.A.M. 2005. Plantas Medicinais: Cura Segura? Química Nova, 28(3):519-528.

Vera RR, Chane MJ. 1999. Chemical composition of the essential oil of marjoram (*Origanum majorana* L.) from Reunion Island. ***Food Chem*** 66: 143–145.

Yamada K, Zaitz C, Framil VMS, Muramatu LH. 2007. Cutaneous sporotrichosis treatment with potassium iodide. A 24 year experience in São Paulo State, Brazil. ***Ver Inst Med Trop São Paulo*** 53(2): 89-93.

4.3 ARTIGO 3

Atividade Anti-*Sporothrix* spp. de Óleos Essenciais Comerciais de Plantas da Família Lamiaceae

Stefanie Bressan Waller; Isabel Martins Madrid; Anna Luiza Silva; Marlete Brum Cleff; Mário Carlos Araújo Meireles; João Roberto Braga de Mello

Artigo formatado nas normas da Revista *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*

Atividade Anti-*Sporothrix* spp. de Óleos Essenciais Comerciais de Plantas da Família Lamiaceae

Stefanie Bressan Waller[1*]; Isabel Martins Madrid[2]; Anna Luiza Silva[3]; Marlete Brum Cleff[3]; Mário Carlos Araújo Meireles[4]; João Roberto Braga de Mello[5]

[1]Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.
[2]Prefeitura Municipal de Pelotas, Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Pelotas-RS, Brasil.
[3]Departmento de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[4]Centro de Controle e Pesquisa em Micologia Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.
[5]Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.

*Endereço para correspondêcia: Rua São Francisco da Califórnia, 90/1001, Higienópolis, Porto Alegre/RS, Brasil. CEP: 90550-080. Telefone: 55 (53) 9953.8241. E-mail: waller.stefanie@yahoo.com.br

RESUMO

Objetivou-se avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais comerciais de *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Origanum vulgare* L. (orégano) e *O. majorana* L. (manjerona) frente ao *Sporothrix* spp., bem como seu potencial citotóxico em células mamíferas e análise química. Quarenta e um *Sporothrix* spp. foram testados através da técnica de Microdiluição em Caldo (CLSI, M38-A2). Ensaio MTT foi realizado para atividade citotóxica dos produtos em células mamíferas do tipo VERO, bem como a análise química foi realizada em cromatografia gasosa com detector de ionização em chamas (CG-FID). As concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram ≤0.07 mg/mL do *O. vulgare* L. para todos os fungos testados, e variaram de ≤0.07 a 4.5 mg/mL para *R. officinalis* L., e ≤0.07 a 2.25 mg/mL para *O. majorana* L. As concentrações fungicidas mínimas (CFM) variaram de ≤0.07 a 0.14 mg/mL (*Origanum vulgare* L.), ≤0.07 a 18 mg/mL (*Rosmarinus officinalis* L.) e ≤0.07 a 4.5 mg/mL (*Origanum majorana* L.). As CIM do itraconazol variou de ≤0.125 µg/mL a >64 µg/mL e a CFM de 32 µg/mL a >64 µg/mL. Em 85% (34/40) dos isolados, a preocupante resistência antifúngica foi observada, e em contrapartida, todos os isolados resistentes foram sensíveis aos fitoterápicos oleosos da família Lamiaceae. A análise química detectou como

compostos majoritátios 1,8-cineol para *R*. *officinalis* L. e *O*. *majorana* L., ao passo que para *O*. *vulgare* L. foi carvacrol. O potencial citotóxico dos óleos foi proporcional às concentrações testadas – 0.078 a 5 mg/mL –, sendo observado menor toxicidade em *R*. *officinalis* L. à menor concentração, o qual manteve a viabilidade celular superior a 80%, ao passo que *O*. *vulgare* L. e *O*. *majorana* L. mantiveram menos de 30% de células viáveis. Este estudo é promissor para maiores investigações das plantas no tratamento da esporotricose, inclusive sobre isolados resistentes.

Palavras-chave: óleos essenciais, família Lamiaceae, antifúngico, esporotricose.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the antifungal activity of commercials essential oils of the *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary), *Origanum vulgare* L. (oregano) and *O*. *majorana* L. (marjoram) against *Sporothrix* spp., as well as its cytotoxic potential in mammalian cells and chemical analysis. Forty-one *Sporothrix* spp. were tested through broth microdilution technique (CLSI M38-A2). MTT assay was performed for cytotoxic activity of the products in VERO cells, as well as the chemical analysis was performed through gas chromatography with flame ionization detector (CG-FID). The minimal inhibitory concentrations (MIC) of *O*. *vulgare* L. were ≤0.07 mg/mL for all tested fungal; of *R*. *officinalis* L. ranged of ≤0.07 to 4.5 mg/mL; and *O*. *majorana* L. ranged of ≤0.07 to 2.25 mg/mL. The minimal fungicidal concentrations (MFC) ranged of ≤0.07 to 0.14 mg/mL for oregano; of ≤0.07 to 18 mg/mL for rosemary and ≤0.07 to 4.5 mg/mL for marjoram. Itraconazole inhibited between ≤0.125 to >64 µg/mL and had fungicidal activity between 32 to >64 µg/mL. In 85% (34/40) of clinical isolates, the alarming clinical resistance was observed, and on the other hand, all resistant isolates were susceptible to the oily phytotherapics of Lamiaceae family. Chemical analysis detected as majoritaries compounds the 1,8-cineole in *R*. *officinalis* L. and *O*. *majorana* L. essential oils and carvacrol in *O*. *vulgare* L. essential oil. Cytotoxic activity increased proportionally to tested concentrations (0.078 to 5 mg/mL) and *R*. *officinalis* L. was the least toxic at lower concentration with more than 80% of viability cell, but for *O*. *vulgare* L. and *O*. *majorana* L. the viables cells were less than 30%. This study is

promissor to more investigations of the plants on the treatment of sporotricosis, including in resistants isolates.

Keywords: essential oils, Lamiaceae family, antifungal, sporotrichosis.

INTRODUÇÃO

Recentemente, casos de infecção por espécies do Complexo *Sporothrix schenckii* – *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. brasiliensis* e outros – em humanos, felinos e caninos tem sido relatados na clínica médica e veterinária (Oliveira *et al*., 2010; Silva-Vergara *et al*., 2012; Guterres *et al*., 2014), sendo *Sporothrix brasiliensis* a espécie mais patogênica e que prevalece nos surtos de esporotricose felina no Brasil (Rodrigues *et al*., 2013; Montenegro *et al*., 2014). Entre as manifestações clínicas, as formas cutânea e linfocutânea são as mais frequentes em cães e gatos, cuja terapia de eleição é preconizada com itraconazol (Madrid *et al*., 2011; Rossi *et al*, 2013). Entretanto, falhas terapêuticas têm sido observadas pelo surgimento de cepas resistentes, devido, entre outros fatores, ao uso inadequado dos antifúngicos durante o tratamento (Rodrigues *et al*., 2013; Stopiglia *et al*., 2014; Chaves *et al*., 2013).

A problemática da resistência antifúngica tem estimulado a busca por compostos químicos em plantas medicinais, sendo os óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e manjerona (*Origanum majorana* L.), pertencentes à família Lamiaceae, conhecidos pela intensa atividade antimicrobiana contra diversos patógenos bacterianos, fúngicos e virais (Vági *et al*., 2005; Saeed e Tariq, 2009; Cleff *et al*., 2012; Erdoğan *et al*., 2012). Fungos de importância médica e veterinária como *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans, Malassezia pachydermatis, Aspergillus* spp., *Cladosporium herbarium*, *Trichophyton* spp. e *Microsporum* spp. já foram descritos com sensibilidade aos óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae (Chami *et al*., 2004; Cleff *et al*., 2008a; Cleff *et al*., 2010; Souza, 2010; Santin *et al*., 2014). Embora apresentam comprovada atividade contra diversos fungos patogênicos, os estudos científicos das plantas citadas sobre *Sporothrix* spp. são escassos (Luqman *et al*., 2007; Cleff *et al*., 2008a; Cleff *et al*., 2010).

Em medicina popular, o uso de óleos essenciais para fins terapêuticos é geralmente atribuído a produtos comerciais, devido à maior facilidade para sua aquisição, no entanto, a qualidade do produto deve ser controlada, uma vez que adulterações no produto podem acarretar na ineficiência terapêutica e, até mesmo, provocar efeitos colaterais no paciente (Veiga Jr. *et al*., 2005). Em produtos comerciais, a adição de substâncias de baixa qualidade pode prejudicar a eficiência antimicrobiana do óleo essencial, o que também pode ocorrer quando a mistura de óleos voláteis de diferentes qualidades é realizada, procedimento este realizado para promover maior rendimento do produto (Simões e Spitzer, 2003). Embora existam poucos estudos antimicrobianos com óleos essenciais da família Lamiaceae adquiridos comercialmente, os mesmos têm apresentado positiva atividade contra diversos patógenos bacterianos e fúngicos (Moreira *et al*., 2012; Cleff *et al*., 2013; Oliveira *et al*., 2013). Na esporotricose, os estudos com óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae concentram-se em produtos extraídos a partir das plantas coletadas *in natura* ou adquiridas comercialmente (Luqman *et al*., 2007; Cleff *et al*., 2008a; Cleff *et al*., 2010), não havendo registros com óleos essenciais comerciais.

Diante deste fato, este trabalho objetivou investigar a atividade anti-*Sporothrix* spp. dos óleos essenciais comerciais de *O*. *vulgare* L., *O*. *majorana* L. e *R*. *officinalis* L. sobre isolados clínicos de felinos e caninos com esporotricose, bem como avaliar a atividade citotóxica e os constituintes químicos presentes nos óleos das plantas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Óleos essenciais de *Origanum vulgare* L., *Rosmarinus officinalis* L. e *Origanum majorana* L. foram adquiridos comercialmente (Ferquima® – Indústria e Comércio Ltda., Vargem Grande Paulista/SP, Brasil – Lotes 212, 141 e 234, respectivamente) com certificação de qualidade e origem da Moldávia, Tunísia e Egito, respectivamente.

Para os testes *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos sobre *Sporothrix* spp., foi utilizada a técnica de Microdiluição em Caldo, seguindo a diretriz do documento M38-A2 (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2008), adaptado para o uso de fitofármacos (Cleff *et al*., 2010). Os óleos essenciais foram testados nas concentrações de 36 a 0.07 mg/mL. Itraconazol comercial veterinário foi testado entre

0.125 a 64 μg/mL. Os resultados foram expressos em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Isolados clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii* oriundos de caninos (*n*: 20) e felinos (*n*: 20) com esporotricose e uma cepa padrão (IOC 1226) (*n*: 1) estocados na micoteca do Centro de Pesquisa e Diagnóstico em Micologia Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, Pelotas/RS, Brasil) foram testados. Todos os isolados foram identificados micologicamente e encontravam-se estocados na fase filamentosa em tubos estéreis contendo ágar batata-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) à 4ºC.

A análise química foi realizada através de cromatografia gasosa de alta resolução (CΓ-FID) em HP 7820A (Agilent) equipada com coluna HP-5 (30m X 0.32mm X 0.25μm) à temperatura inicial de 70ºC e adição de 3ºC/min até atingir 240ºC. A temperatura do injetor foi de 250ºC e do detector FID, 260ºC. A velocidade de arraste do gás hidrogênio foi de 3 mL/min, e split 1:30. Soluções dos óleos foram diluídas em clorofórmio a 1% e injetadas no cromatógrafo a um volume de 1μL. Os dados foram adquiridos através do programa EZChrom Elite Compact® (Agilent).

Os efeitos citotóxicos foram estimados através do ensaio MTT (Mosmann *et al*., 1983) com células mamíferas do tipo VERO crescidas em meio RPMI-1640 suplementada com L-glutamina e isento de bicarbonato de sódio (pH 7.2), sendo as concentrações testadas de 5 a 0.078 mg/mL. Os testes foram realizados em triplicata e para os controles negativos, utilizou-se somente RPMI-1640. As amostras foram mensuradas em leitora de placas em espectrofotômetro de comprimento de onda de 540 nm e avaliada a aparência celular através de microscópio invertido. Os resultados foram expressos por porcentagem de inibição relativa ao controle de células, considerado este 100%.

A análise estatística foram realizados através da análise de variância e comparação das médias geométricas dos dados de acordo com o teste de Tukey através do *software* estatístico BioEstat® na versão 5.3 e o valor $p<0.05$ considerado de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados apresentaram sensibilidade aos óleos essenciais testados (Tab. 1). A $CIM_{50/90}$ do óleo de *Rosmarinus officinalis* L. foi, respectivamente, 0.28 mg/mL e 1.12 mg/mL, e $CFM_{50/90}$ foi 1.12 mg/mL e 2.25 mg/mL. A atividade anti-*Sporothrix* spp. desta planta já havia sido demonstrada por Luqman *et al*. (2007) na CIM de 11 mg/mL, o qual não observaram atividade fungicida nesta concentração. Em contrapartida, nossos testes demonstraram que alecrim apresentou atividade fungicida para todos os isolados de *Sporothrix* spp., cuja máxima CFM foi de 18 mg/mL para um isolado felino (5% - 1/20) e um canino (5% - 1/20).

Em *O*. *majorana* L., os isolados clínicos testados foram sensíveis, na $CIM_{50/90}$ de 0.14 mg/mL e 0.56 mg/mL, respectivamente e $CFM_{50/90}$ de 0.28 mg/mL e 2.25 mg/mL, diferindo estatiscamente dos resultados de *R*. *officinalis* L. ($p<0.05$). Embora não existam estudos da atividade antifúngica da manjerona no Complexo *Sporothrix schenckii*, essa planta apresentou potencial antifúngico promissor, visto que os fatores de virulência do Complexo *Sporothrix schenckii* são reconhecidos e dificultam o sucesso da terapia convencional (Madrid *et al*., 2010a; Madrid *et al*., 2011).

Por sua vez, *Origanum vulgare* L. apresentou forte atividade inibitória e fungicida, nas $CIM/CFM_{50/90}$ ≤0.07 mg/mL, sendo estes valores de duas a seis vezes inferiores em comparação aos resultados das demais plantas ($p<0.05$). Entre os poucos estudos da atividade antifúngica de plantas da família Lamiaceae sobre a esporotricose, Cleff *et al*. (2008a) já haviam demonstrado que isolados felinos e humanos de *S*. *schenckii* foram sensíveis ao óleo essencial de *O*. *vulgare* L. nas CIM de 250 µL/mL. Em outro estudo, o óleo de orégano inibiu *Sporothrix* spp. nas CIM de 250 a 500 µL/mL (Cleff *et al*., 2010). Embora os valores expressos sejam distintos dos presentes resultados, devido à falta de padronização nos testes *in vitro* com plantas medicinais (Ostrosky *et al*., 2008), observa-se que os resultados dos estudos de Cleff *et al*. (2008a, 2010) foram similares aos nossos, embora a origem dos produtos tenha sido distinta, visto a origem era do Chile, ao passo que o nosso óleo era originário da Moldávia, o que demonstra boa atividade do *Origanum vulgare* L. Menores concentrações do óleo de orégano ainda devem ser testadas para se estabelecer os valores das concentrações inibitórias sobre *Sporothrix* spp.

Tabela 1. Atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* de óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L., *Origanum vulgare* L. e *Origanum majorana* L. contra fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* isolados de felinos e caninos com esporotricose.

Isolamento do Complexo *Sporothrix schenckii*		*Rosmarinus officinalis* L. (mg/mL)		*Origanum vulgare* L. (mg/mL)		*Origanum majorana* L. (mg/mL)		Itraconazol (μg/mL)	
		CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Felina (*n*: 20)	Variação	≤0.07–1.12	≤0.07–18	≤0.07	≤0.07–0.14	≤0.07–0.56	≤0.07–4.5	≤0.125–>64	32– >64
	50%	0.28	2.25	≤0.07	≤0.07	≤0.07	0.14	2	>64
	90%	1.12	4.5	≤0.07	≤0.07	0.56	2.25	>64	>64
Canina (*n*: 20)	Variação	≤0.07–4.5	0.28–18	≤0.07	≤0.07	≤0.07–2.25	≤0.07–4.5	≤0.125–>64	32– >64
	50%	0.28	1.12	≤0.07	≤0.07	0.14	0.28	1	>64
	90%	2.25	2.25	≤0.07	≤0.07	0.28	1.12	64	>64
IOC 1226 (*n*: 1)	Variação	1.12	1.12	≤0.07	≤0.07	0.14	0.28	≤0.125	>64
Todos (*n*: 41)	Variação	≤0.07–4.5	≤0.07–18	≤0.07	≤0.07–0.14	≤0.07–2.25	≤0.07–4.5	≤0.125–>64	32– >64
	50%	0.28	1.12	≤0.07	≤0.07	0.14	0.28	2	>64
	90%	1.12	2.25	≤0.07	≤0.07	0.56	2.25	>64	>64

50% e 90% referem-se à porcentagem em relação ao total de isolados fúngicos testados.

Em relação ao itraconazol, as diretrizes do CLSI recomendam os testes nas concentrações de 0.0313 a 16 µg/mL, valores estes insuficientes para inibir 17% (07/41) dos isolados fúngicos e eliminar o crescimento de 100% (41/41) deles. Por este motivo, optou-se em aumentar as concentrações testadas entre 0.125 a 64 µg/mL, a fim de detectar atividade antifúngica do fármaco. Os resultados demonstraram que itraconazol apresentou atividade inibitória, cuja CIM_{50} dos isolados felinos e caninos foram 2 µg/mL e 1 µg/mL, respectivamente. Entretanto, a CIM_{90} para os isolados caninos foi 64 µg/mL, ao passo que para felinos foi >64 µg/mL, não sendo observada inibição em 15% (03/20) dos isolados felinos e 10% (02/20) dos caninos, totalizando cinco isolados fúngicos resistentes às CIM do itraconazol.

A atividade fungicida do itraconazol foi fracamente observada em somente 10% (02/20) dos isolados felinos (CFM de 32 µg/mL) e 20% (04/20) dos isolados caninos (CFM de 32 a 64 µg/mL), sendo os demais isolados clínicos considerados resistentes ao antifúngico. A resistência de fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* já foi relatada por estudos de Marimon *et al*. (2008) e Rodrigues *et al*. (2014) sobre itraconazol e outros antifúngicos, sendo esta situação alarmante, visto que a esporotricose é uma doença zoonótica de ocorrência mundial e com elevados casos de surtos no Brasil (Madrid *et al*., 2012; Montenegro *et al*., 2013; Rodrigues *et al*., 2014). Diversos fatores têm contribuído para o surgimento desta problemática, principalmente o uso inadequado dos antifúngicos, bem como a negligência e o abandono à terapia pelos proprietários, devido ao tempo prolongado do tratamento, custo elevado dos fármacos e dificuldade na administração medicamentosa nos animais (Chaves *et al*., 2013).

Interessantemente, todos os isolados resistentes ao itraconazol foram sensíveis aos óleos essenciais das plantas da família Lamiaceae e cujos valores variaram de ≤0.07 a 1.12 mg/mL (CIM) e 1.12 a 4.5 mg/mL (CFM) para *R*. *officinalis* L.; ≤0.07 mg/mL (CIM/CFM) para *O*. *vulgare* L.; e de ≤0.07 a 0.56 mg/mL (CIM) e de 0.14 a 1.12 mg/mL (CFM) para *O*. *majorana* L. Os produtos fitoterápicos apresentaram atividade anti-*Sporothrix* spp. com diferença estatística significativa em relação ao itraconazol ($p>0.05$), que, por sua vez, não apresentou atividade antifúngica para a maioria dos isolados testados.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre isolados de *Sporothrix* spp. resistentes ao itraconazol incentiva as pesquisas em fitoterapia, por serem essas espécies botânicas promissoras no controle da esporotricose. Stopiglia *et al*. (2011) também demonstrou a suscetibilidade de cepas de *Sporothrix* spp. resistentes ao itraconazol sobre extratos metanólicos de plantas do gênero *Pterocaulon* (família Asteraceae) entre 5000 a 156 µg/mL. Assim como no presente trabalho, o óleo essencial de *R*. *officinalis* L. inibiu a atividade de bactérias do Complexo *Burkholderia cepacia* resistentes à ciprofloxacina (Maida *et al*., 2014), bem como de *Mycobacterium smegmatis* resistentes à ciprofloxacina e norfloxacina, *Escherichia coli* ao ácido nalidíxico e *C*. *albicans* resistente à clotrimazol e anfotericina B (Luqman *et al*., 2007).

A variação nos valores de suscetibilidade de *Sporothrix* spp. aos fitoterápicos pode ser influenciada por fatores de virulência do próprio patógeno, bem como em função da composição química do óleo essencial, uma vez que a sua atividade antifúngica está atribuída às substâncias químicas presentes que conferem proteção à planta contra patógenos microbianos (Chami et al., 2004; Singh et al., 2012; Maida et al., 2014).

O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. apresentou os constituintes 1,8-cineol em elevada concentração, seguido de α-pineno, em relação aos demais constituintes (Figura 1), o qual ambos compostos apresentaram comprovada atividade antifúngica (Jiang *et al*., 2011). A composição majoritária de nosso estudo está em acordo com demais trabalhos (Kabouche *et al*., 2005; Jiang *et al*., 2011; Cleff *et al*., 2012; Maida *et al*., 2014). No entanto, outros compostos foram majoritários no óleo essencial de alecrim para Santoyo *et al*. (2005), que encontraram acetato de bornila e verbenona, e para Prins *et al*. (2006), com cânfora, eucaliptol e β-mirceno. Essa diferença pode ser atribuída pela origem dos produtos, visto que nosso óleo de alecrim foi adquirido comercialmente e era proveniente da Tunísia, diferentemente dos demais trabalhos, que eram oriundos de plantas adquiridas e submetidas aos processos de extração, e que eram originadas de outras regiões, como Brasil (Prins *et al*., 2006).

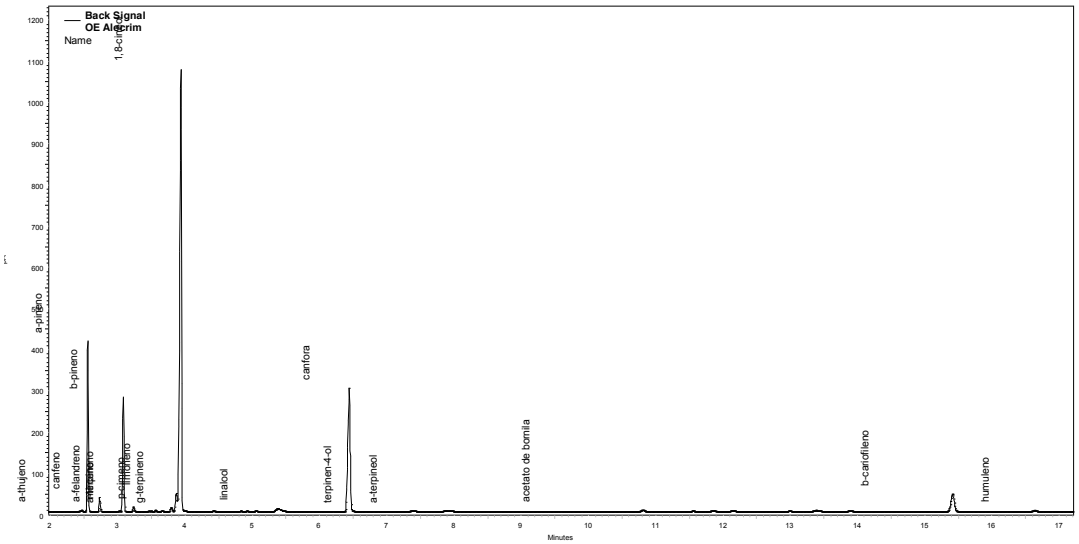

Figura 1. Constituintes identificados no óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. por cromatografia gasosa (CГ-FID): α-thujeno (0.2%), α-pineno (12.2%), canfeno (1.1%), β-pineno (9.4%), mirceno (0.5%), α-felandreno (0.1%), α-terpineno (0.1%), p-cimeno (0.4%), limoneno (2.0%), 1,8-cineol (49.4%), γ-terpineno (0.1%), linalool (1.0%), cânfora (17.8%), terpinen-4-ol (0.2%), α-terpineol (0.5%), acetato de bornila (0.3%), α-copaeno (0.3%), β-cariofileno (3.7%), humuleno (0.2%) e outros constituintes (0.4%).

No óleo de *Origanum vulgare* L., a composição majoritária correspondeu ao carvacrol, seguido de γ-terpineno (Figura 2), os quais corroboram com demais estudos (Cleff *et al*., 2008a; Maida *et al*., 2014), entretanto, Cleff *et al*. (2010) encontraram as substâncias timol e 4-terpineol em concentrações superiores ao carvacrol e demais constituintes. Os estudos comparativos não eram de origem comercial, como o nosso trabalho, o qual pode ter influenciado na diferença de composição majoritária, mesmo que estes trabalhos tenham demonstrado atividade antimicrobiana. Além disso, a composição química majoritária é influanciada por fatores relacionados ao cultivo da planta, tais como tipo de clima, sazonalidade, área geográfica, condição de plantação, técnica de obtenção do produto, bem como as condições de secagem e armazenamento, os quais interferem quantitativamente na composição química dos óleos essenciais (Prins *et al*., 2006; Celiktas *et al*., 2007).

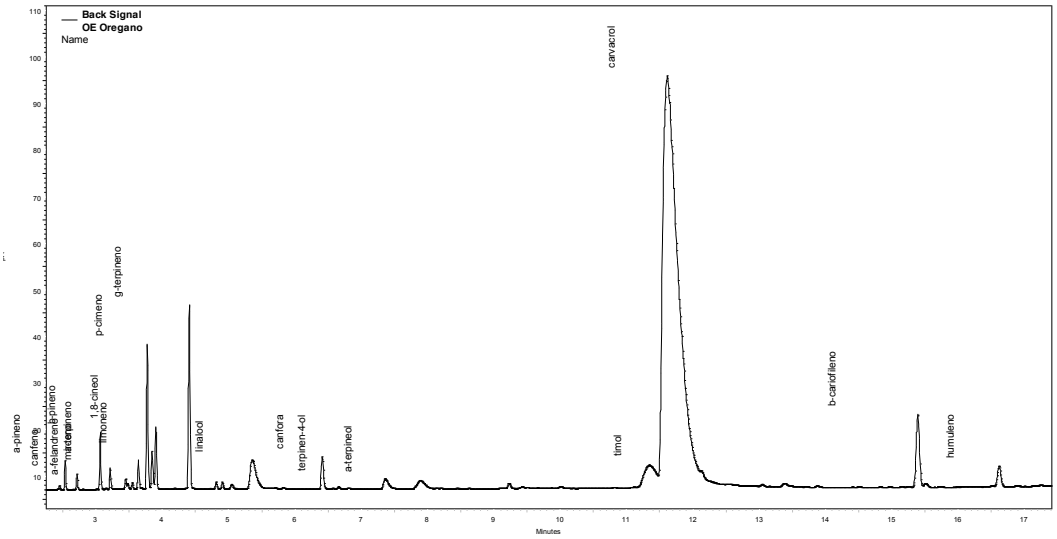

Figura 2. Constituintes identificados no óleo essencial de *Origanum vulgare* L. por cromatografia gasosa (CГ-FID): α-pineno (0.4%), canfeno (0.2%), β-pineno (0.9%), mirceno (0.4%), α-felandreno (0.1%), α-terpineno (0.6%), p-cimeno (2.5%), limoneno (0.7%), 1,8-cineol (1.1%), γ-terpineno (3.6%), linalool (2.1%), cânfora (0.8%), terpinen-4-ol (0.7%), α-terpineol (0.8%), timol (3.0%), carvacrol (73.9%), β-cariofileno (2.8%), humuleno (0.9%) e outros (4.5%).

Os constituintes majoritários de *Origanum majorana* L. foram 1,8-cineol e 4-terpineol (Figura 3). Os compostos químicos encontrados foram similares aos descritos científicos (Marino *et al*. 2001; Burt e Reinders, 2004; Vági *et al*., 2005; Busatta *et al*., 2008; Santin, 2013; Sfeir *et al*., 2013), porém, a composição majoritária diferiu dos achados de Marino *et al*. (2001), a qual timol e carvacrol foram prevalentes, sendo estes compostos encontrados em alta quantidade no óleo de *O*. *vulgare* L. Nosso estudo auxiliou para o maior conhecimento da atividade de óleos essenciais de plantas medicinais disponíveis comercialmente em concentrações e composições distintas. Sabe-se que a falta de padronização em testes com fitoterápicos dificulta a manutenção de pesquisas com mesmas composições e concentrações testadas (Ostrosky *et al*., 2008), sendo um fator de entrave na comparação de resultados científicos.

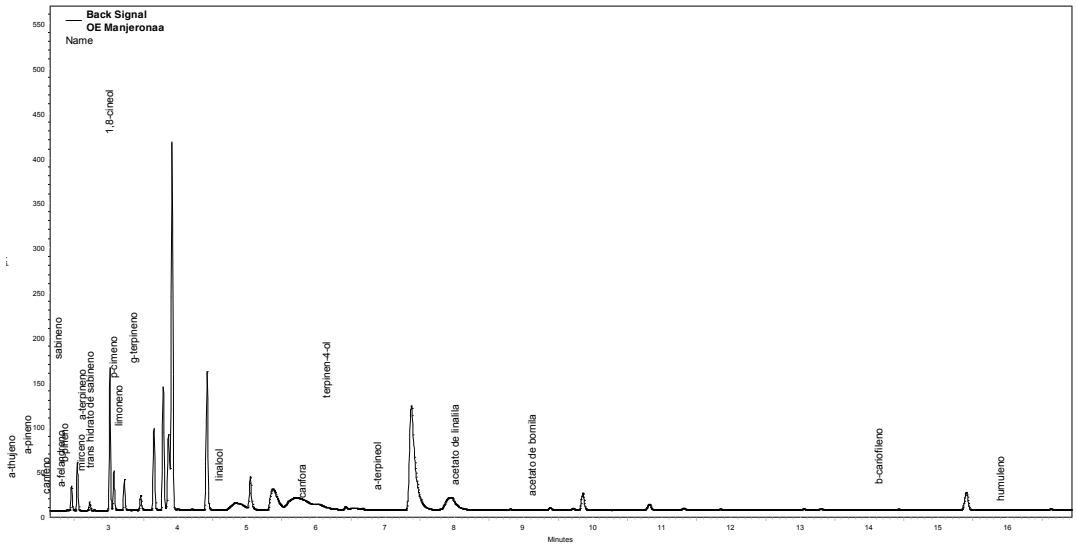

Figura 3. Constituintes identificados no óleo essencial de *Origanum majorana* L. por cromatografia gasosa (CГ-FID): α-thujeno (1.1%), α-pineno (2.0%), canfeno (0.4%), sabineno (6.7%), β-pineno (1.9%), mirceno (1.6%), α-felandreno (0.9%), α-terpineno (4.6%), p-cimeno (7.0%), limoneno (5.3%), 1,8-cineol (20.9%), β-ocimeno (0.1%), γ-terpineno (8.5%), trans-hidrato sabineno (2.3%), linalool (4.4%), cânfora (0.2%), terpinen-4-ol (20.4%), α-terpineol (4.7%), acetato de linalila (1.8%), acetato de bornila (0.8%), β-cariofileno (2.2%), humuleno (0.2%) e outros constituintes (2.1%).

Embora o mecanismo de ação dos compostos não estejam elucidados sobre os patógenos fúngicos, acredita-se que os óleos essenciais provoquem danos às enzimas responsáveis pela produção de energia e síntese de compostos estruturais (Lambert *et al*., 2001); sensibilizam a camada fosfolipídica da membrana celular dos microorganismos, aumentando a permeabilidade e provocando perda de seus componentes intracelulares (Cox *et al*., 2000; Ultee e Smid, 2001); ou danificam a membrana plasmática, reduzindo a produção do ergosterol fúngico (Pinto *et al*., 2006).

Em relação à atividade citotóxica, os oleos essenciais apresentaram diferentes graus de toxicidade em células mamíferas, sendo observado um efeito citotóxico gradualmente proporcional às concentrações testadas. O óleo de *O*. *vulgare* L. foi tóxico na menor concentração testada (78 μg/mL) com viabilidade celular inferior a 25%, ao passo que o óleo de *O*. *majorana* L. apresentou toxicidade superior a 75%. No entanto, o óleo de *R*. *officinalis* L. apresentou baixo percentual de citotoxicidade, visto que 80% das células mamíferas apresentaram-se viáveis, no entanto, a toxicidade do alecrim foi observada a partir da concentração de 312 μg/mL (Figura 4), diferindo estatisticamente dos óleos essenciais de orégano e manjerona ($p<0.01$). Embora tenha sido observada toxicidade celular, o estudo foi conduzido *in vitro*, o qual expõe as células diretamente ao produto testado, tornando-a mais suscetível (Nogueira e Andrade, 2011). Em

contrapartida, estudos toxicológicos *in vivo* devem ser realizados para avaliação do efeito do fitoterápico, em especial em animais com esporotricose experimental, uma vez que ações orgânicas, como pH gástrico, metabolização hepática e renal, entre outras, influenciam na atividade dos fitoterápicos, bem como a dose utilizada e a frequeência de administração (Veiga Jr. *et al*., 2005; Nogueira e Andrade, 2011).

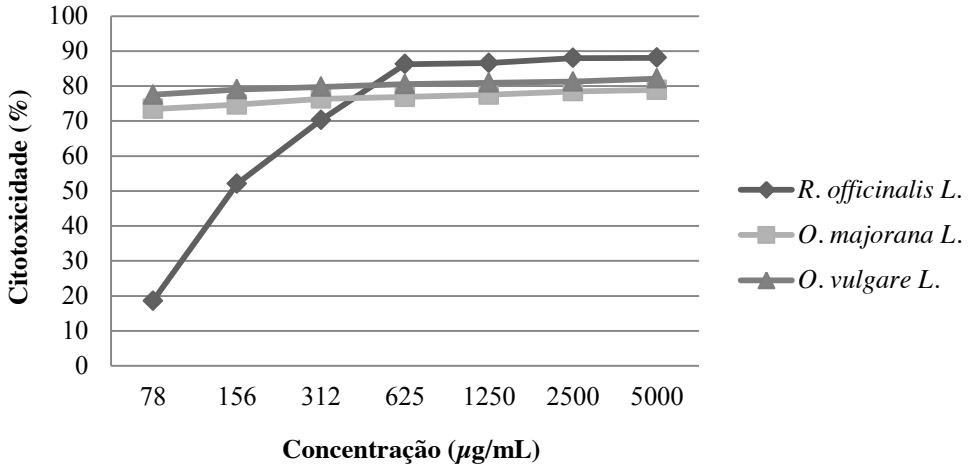

Figura 4. Porcentual de toxicidade celular *in vitro* dos óleos essenciais comerciais de plantas selecionadas da família Lamiaceae – *Rosmarinus officinalis* L., *Origanum majorana* L. e *Origanum vulgare* L. – após incubação por 48 horas.

Em outros estudos com óleos essenciais das mesmas plantas utilizadas, Erdoğan *et al*., (2012) demonstraram concentrações máximas não-tóxicas dos óleos essenciais de *R*. *officinalis* L. e *O*. *majorana* L. em células VERO foram de 3.2 µg/mL, ao passo que de *O*. *vulgare* L. foi de 1.6 µg/mL. Estas concentrações foram de 21 a 43 vezes inferiores às testadas no presente estudo, o que influencia nos resultados de citotoxicidade. Salienta-se a importância em avaliar a atividade citotóxica em concentrações superiores, de preferência naquelas próximas às concentrações com atividade anti-*Sporothrix* spp. Em óleo de *O*. *vulgare* L. a 3%, Cleff *et al*. (2008b) relataram a ausência de alterações clínicas, hematológicas e a nível de tecidos reprodutivo, digestivo, hepático e renal do orégano, quando administrado diariamente durante 30 dias pelas vias oral e intravaginal de ratas fêmeas Wistar, demonstrando seu efeito não tóxico *in vivo*, o que torna essa planta promissora para maiores estudos, especialmente na esporotricose.

O óleo essencial de *R*. *officinalis* L. apresentou menor toxicidade em relação às demais plantas. Entretanto, o óleo de *O*. *vulgare* L. foi relatado com menor potencial tóxico sobre células VERO em comparação aos óleos de alecrim e manjerona (Erdoğan *et al*., 2012). Esse fato provavelmente está relacionado à composição química dos produtos, uma vez que fatores relacionados ao cultivo botânico, como sazonalidade, área geográfica, tipo de solo, formas de colheita e armazenamento das plantas, bem como as formas de extração dos óleos, interferem na qualidade dos produtos e influenciam na composição química (Cernicka e Subik, 2007), podendo produzir substâncias com maior ou menor grau de toxicidade sobre as células mamíferas.

Em outro estudo experimental em modelos animais, a administração oral do óleo essencial de *R*. *officinalis* L. nas doses de 50 a 5000 mg/Kg não apresentou letalidade e nem sinais toxicológicos, como piloereção e vômitos, durante sete dias de administração, sendo seguro seu uso *in vivo* (Faria, 2005). Entretanto, testes com *O*. *majorana* L. a 6% e de *R*. *officinalis* L. a 24% revelaram graus de irritações cutânea/ocular aguda leve para manjerona e moderada para alecrim, sendo recomendado o uso cauteloso do alecrim *in vivo* (Santin, 2013).

Maiores testes com outras vias de administração, como oral, devem ser realizados, principalmente no que tange à complementação terapêutica das enfermidades. Veiga Jr. *et al*. (2005) citam que o grau de toxicidade do fitoterápico é dependente de diversos fatores, como a dose utilizada e a frequência de administração, e que baixas dosagens podem provocar intoxicação alérgicas em pacientes sensíveis e irritações cutâneas, observados na administração oral de *O*. *vulgare* L., *O*. *majorana* L. e *R*. *officinalis* L. (Baričevič e Bartol, 2002; Lorenzi e Matos, 2006). O estudo dos efeitos tóxicos deve ser abrangido para maior conhecimento dos efeitos das plantas selecionadas sobre o paciente, especialmente naqueles acometidos pela esporotricose.

CONCLUSÕES

Os óleos essenciais testados apresentaram satisfatória atividade anti-*Sporothrix* spp. *in vitro* sobre todos os isolados fúngicos, inclusive sobre aqueles resistentes ao itraconazol. Na análise química, o composto 1,8-cineol foi o majoritários para os óleos de *R*. *officinalis* L. e *O*. *majorana* L., ao passo que carvacrol foi para o óleo de *O*. *vulgare* L. O óleo de *R*. *officinalis* L. apresentou menor citotoxicidade em relação às

demais plantas, nas menores concentrações testadas. Os bons resultados *in vitro* da atividade antifúngica das plantas da família Lamiaceae incentivam a realização de maiores investigações para seu uso promissor no tratamento da esporotricose. Ensaios relacionados à farmacocinética e farmacodinâmica dos óleos essenciais, incluindo testes em modelos experimentais, devem ser realizados para o maior conhecimento dos efeitos destas plantas.

CONFLITOS DE INTERESSES

Os autores declaram não existir conflitos de interesse para publicação deste artigo.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao CNPq, CAPES and FAPERGS pelo suporte financeiro.

REFERÊNCIAS

BARIČEVIČ, D.; BARTOL, T. The biological/pharmacological activity of the oregano genus . In: KINTZIOS, S. (Ed). Oregano: the genera *Origanum* and *Lippia*, Medicinal and aromatic plants – industrial profiles. England: Taylor & Francis, 2002. p.177-214.

BURT, S.A.; REINDERS, R.D. 2004. Antibacterial activity of selected plant essential oils agains Escherichia coli O157:H7. *Lett*. *Appl*. *Microbiol*., v.36, p.162-167, 2004.

BUSATTA, C.; VIDAL, R.S.; POPIOLSKI, A.S.; MOSSI, A.J. *et al*. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as na antimicrobial agent in sausage. *Food Microbiol*., v.25, p.207-211, 2008.

CELIKTAS, O.Y.; KOCABAS, E.E.H.; BEDIR, E.; SUKAN, F.V. *et al*. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem*., v.100, p.553-559, 2007.

CERNICKA, J.; SUBIK, J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. *Int*. *J*. *Antimicrob*. *Agents*., v.27, p.403-408, 2006.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J. *et al*. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosupressed rats. *Braz*. *J*. *Infect*. *Dis*., v.8, p.217-226, 2004.

CHAVES, A.R.; CAMPOS, M.P.; BARROS, M.B.L.; CARMO, C.N. *et al*. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis – Study of 147 Cases. *Zoonoses Public Health*., v.60, p.149-153, 2013.

CLEFF, M.B.; MADRID, I.; MEINERZ, A.R.; MEIRELES, M.C.A.; *et al*. Essential oils against *Candida* spp: *in vitro* antifungal activity of *Origanum vulgare*. *Afr*. *J*. *Microbiol*. *Res*., v.7, n.20, p.2245-2250, 2013.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.O.; XAVIER, M.O. *et al*. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq*. *Bras*. *Med*. *Vet*. *Zootec*., v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; SALLIS, E.S.; ANTUNES, T.A. *et al*. Toxicidade pré-clínica em doses repetidas do oleo essencial de *Origanum vulgare* L. (orégano) em ratas Wistar. *Lat*. *Am*. *J*. *Pharm*., v.27, n.5, p.704-709, 2008b.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O. *et al*. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. *Rev*. *Bras*. *Plantas Med*., v.14, n.1, p.43-49, 2012.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; SCHUCH, L.F.D.; RODRIGUES, M.R.A. *et al*. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix schenckii*. *Arq*. *Bras*. *Med*. *Vet*. *Zootec*., v.60, n.2,, p.513-516, 2008a.

CLSI M38-A2. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi*. Approved Standard - Third Edition, 2008.

COX, S.D.; MANN, C.M.; MARKHAM, J.L.; BELL, H.C. *et al*. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J*. *Appl*. *Microbiol*., v.88, n.1, p.170-175, 2000.

ERDOĞAN, I.O.; OZCELIK, B.; KARTAL, M.; KAN, Y. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. *Turk*. *J*. *Biol*., v.36, p.239-246, 2012.

FARIA, L.R.D. *Validação farmacológica do óleo essencial de Rosmarinus officinalis L. (alecrim) – atividades antiinflamatória e analgésica*. 2005. 66f. (Mestrado em Ciência Animal) – Universidade José do Rosário Vellano, Alfenas/MG.

FERRARA, L.K; MONTESANTO, D., CHIANTESE, C. *Origanum marjoran* L. in medicine and foods. *Ingred*. *Aliment*., v.2, p.23-25, 2003.

GUTERRES, K.A.; MATOS, C.B.; OSÓRIO, L.G.; SCHUCH, I.D. *et al*. The use of (1-3) β-glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. *Mycopathologia*., v.177, n.3-4, p.217-221, 2014.

JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.J.; WANG, W. *et al*. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ*. *Toxicol*. *Phar*., v.32, p.63-68, 2011.

KABOUCHE, Z.; BOUTAGHANE, N.; LAGGOUNE, S.; KABOUCHE, A. *et al*. Comparative antibacterial activity of five Lamiaceae essential oils from Algeria. *Int*. *J*. *Aroma*., v.15, n.3, p.129-33, 2005.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J*. *Appl*.*Microbiol*., v.91, n.3, p.453-62, 2001.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. (Ed.). Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas. 1.ed. Instituto Plantarum, São Paulo, Brasil, 2006. 512p

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G.R.; DAROKAR, M.P.; KALRA, A. *et al*. Potential of Rosemary oil to be used in drug-resistant infections. *Altern*. *Ther*. *Health Med*., v.13, n.5, p.54–59, 2007.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; NOBRE, M.O. *et al*. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis/A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. *Mycopathologia*., v.173, n.4, p.265-273, 2012.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; XAVIER, M.O.; GUIM, T.N. *et al*. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. *Microb*. *Infect*., v.1, p.162-165, 2010a.

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

MAIDA, I.A.; NOSTRO, L.; PESAVENTO, G.; BARNABEI, M.; *et al*. Exploring the Anti-*Burkholderia* cepacia Complex Activity of Essential Oils: A Preliminary Analysis. *Evid*. *Based Complement*. *Alternat*. *Med*., Article ID 573518, 10 pages, 2014.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENE, J.; CANO, J.; *et al*. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix schenckii*. *Antimicrob*. *Agents Chemother*., v.52, p.732-734, 2008.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int*. *J*. *Food Microbiol*., 67:187-195, 2001.

MONTENEGRO, H.; RODRIGUES, A.; DIAS, M.; da SILVA, E.; *et al*. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis* : an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. BMC *Vet*. *Res*., v.10, n.1, p.269, 2014.

MOREIRA, M.S.C.; PAULINO, M.R.; CAVALCANTI, Y.W.; ALMEIDA, L.F.D. *et al*. Atividade antifúngica de soluções antimicrobianas disponíveis comercialmente e de produtos naturais à base de *Rosmarinus officinalis* (alecrim). *Int*. *J*. *Dent*., v.11, n.1, p.38-42, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J*. *Immunol*. *Methods*, v.65, n.1-2, p.55-63, 1983.

OLIVEIRA, D.C.; LOPES, P.G.M.; SPADER, T.B.; MAHL, C.D. *et al*. Antifungal susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S*. *brasiliensis* and *S*. *luriei* of the *S*. *schenckii* Complex identified in Brazil. *J*.*Clin*. *Microbiol*., v.49, n.8, p.3047-3049, 2011.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; PICCOLI, R.H. Essential oils of thyme and rosemary in the control of *Listeria monocytogenes* in raw beef. *Braz*. *J*. *Microbiol*., v.44, n.4, p.1181-1188, 2013.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.; KANEKO, T.M.; *et al*. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev*. *Bras*. *Farmacogn*., v.18, n.2, p.301-307, 2008.

762 PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M.J. *et al*. Antifungal
763 activity of the essential oil of Thymus pulegioides on *Candida*, *Aspergillus* and
764 dermatophyte species. *J*. *Med*. *Microbiol*., v.55, n.10, p.1367-73, 2006.

765 PRINS, C.L.; LEMOS, C.L.S.; FREITAS, S.P. Efeito do tempo de extração sobre a
766 composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). *Rev*.
767 *Bras*. *Plantas Med*., v.8, n.4, p.92-95, 2006.

768 RODRIGUES, A.M.; de HOOG, G.S.; ZHANG, Y.; CAMARGO, Z.P. Emerging
769 sporotrichosis in driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. *Emerg*.
770 *Microbes Infect*. 3:e32, 2014.

771 RODRIGUES, A.M.; de MELO, T.M.; de HOOG, G.S.; SCHUBACH, T.M.P.; *et* al.
772 Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline
773 sporotrichosis outbreaks. *Plos*. *Negl*. *Trop*. *Dis*., 7:e2281, 2013.

774 ROSSI, C.N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C. E. Retrospective assessment of the
775 treatment of sporotrichosis in cats and dogs using itraconazole. *Acta Sci*. *Vet*., n.42,
776 p.1114, 2013.

777 SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.)
778 against gram positive bacteria, *Pak*. *J*. *Pharm*. *Sci*., v.22, n.4, p.421-424, 2009.

779 SANTIN, R.; GIORDANI, C.; MADRID, I.M.; MATOS, C.B. *et al*. Antifungal activity
780 of *Origanum vulgare* essential oil against *Malassezia pachydermatis*. *Arq*. *Bras*. *Med*.
781 *Vet*. *Zootec*., v.66, n.2, p.367-373, 2014.

782 SANTIN, R. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família
783 Lamiaceae. 2013. 104f. (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do
784 Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

785 SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; *et al*. Chemical composition
786 and antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil obtained via
787 supercritical fluid extraction. *J*. *Food Prot*., v.68, n.4, p.790–795, 2005.

788 SFEIR, J.; LEFRANÇOIS, C.; BAUDOUX, D.; DERBRÉ, S.; *et al*. *In vitro*
789 antibacterial activity of essential oils against *Streptococcus pyogenes*. *Evid*. *Based*
790 *Complement*. *Alternat*. *Med*. Article ID 269161, 9 pages. 2013.

SILVA-VERGARA, M.L.; CAMARGO, Z.P.; SILVA, P.F.; ABDALLA, M.R.; *et al*. Disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with endocardial and ocular involvement in na HIV-infected patient. *Am. J. Trop. Med. Hyg.,* v.86, n.3, p.477-480, 2012.

SIMÕES, C.M.O.E.; SPITZER, V. Óleos Voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN,G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. (Ed). Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 5ª ed. Porto Alegre, Brasil: Editora da UFRGS, 2003. p.467-495

SINGH, D.; KUMAR, T.R.S.; GUPTA, V.K.; CHATURVEDI, P. Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulation. *Indian J. Exp. Biol*., v.50, p.714-717, 2012.

STOPIGLIA, C.D.O.; VIANNA, D.R.; MEIRELLES, G.C.; TEIXEIRA, H.; *et al*. Antifungal Activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. *J. Mycol. Méd*., v.21, n.3, p.169-172, 2011.

STOPIGLIA, C.D.O.; MAGAGNIN, C.M.; CASTRILLÓN, M.R., MENDES, S.D., *et al*. Antifungal susceptibilities and identification of species of the *Sporothrix schenckii* Complex isolated in Brazil. *Med Mycol*., v.52, n.1, p.56-64, 2014.

ULTEE, A.; SMID, E.J. Influence of carvacrol on groth and toxin production by *Bacillus cereus*. *Int. J. Food Microbiol*., v.64, p.373-378, 2001.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHADJA, Á.; HÉTHELYI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* l. extracts obtained with ethyl acohol and supercritical carbon dioxide. *Food Res. Int*., v.28, p.51-57, 2005.

VEIGA Jr., V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura? *Química Nova* (*Impresso*), v.28, n.3, p.519-528, 2005.

4.4 ARTIGO 4

Extratos de Plantas Selecionadas da Família Lamiaceae contra Fungos do Complexo *Sporothrix schenckii*

Stefanie Bressan Waller; Isabel Martins Madrid; Luciana Laitano Dias de Castro; Marlete Brum Cleff; Mário Carlos Araújo Meireles; João Roberto Braga de Mello

Artigo formatado nas normas da Revista *Journal de Mycologie Médicale*

Extratos de Plantas Selecionadas da Família Lamiaceae contra Fungos do Complexo *Sporothrix schenckii*

Extraits de Plantes de la Famille Lamiaceae contre Sporothrix schenckii *Complexe*

S.B. Waller[a,d,*]; I.M. Madrid[b]; L.L.D. Castro[c]; M.B. Cleff[d]; M.C.A. Meireles[e]; J.R.B. de Mello[f]

[a] *Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.*

[b] *Prefeitura Municipal de Pelotas, Centro de Controle de Zoonoses (CCZ), Pelotas-RS, Brasil.*

[c] *Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas-RS, Brasil.*

[d] *Departmento de Clínicas Veterinárias, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.*

[e] *Centro de Controle e Pesquisa em Micologia Veterinária, Departamento de Veterinária Preventiva, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas-RS, Brasil.*

[f] *Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre-RS, Brasil.*

*Autor para correspondência.

E-mail: waller.stefanie@yahoo.com.br (S. B. Waller).

RESUMO

A resistência antifúngica observada em fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* tem incentivado a busca por alternativas terapêuticas para o tratamento da esporotricose. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae já é conhecida, no entanto, há escassos estudos destas plantas na forma de extratos aquosos, os quais são vantajosos pela facilidade de uso pela população e por apresentar maior rendimento. Este trabalho objetivou avaliar a atividade anti-*Sporothrix* spp. de preparos de infusões a 10 e 60 minutos, decocção e extratos hidroalcoólicos de *Origanum vulgare* L. (orégano), *O. majorana* L. (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim) contra isolados clínicos de felinos e caninos, bem como analisar a atividade citotóxica desses produtos. Os testes de suscetibilidade foram realizados através da técnica de Microdiluição em Caldo (CLSI M38A2). Os resultados foram expressos em concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM). Todos os extratos de orégano apresentaram forte atividade anti-*Sporothrix* spp. (CIM_{50}: 5 mg/mL; CFM_{50}: 40 mg/mL). Em manjerona, o extrato hidroalcoólico apresentou CIM_{50} e CFM_{50} de 40 mg/mL, enquanto que os demais extratos apresentaram baixa atividade, incluindo os extratos de alecrim (CIM_{50}/CFM_{50}>40 mg/mL). Através de ensaios MTT em células VERO, observou-se proporção direta entre toxicidade e concentração dos extratos. A infusão a 10 minutos e a decocção de *O. vulgare* L. apresentaram toxicidade superior a 70% das células a partir da concentração de 1.25 mg/mL, ao passo que a infusão a 60 minutos apresentou toxicidade celular superior a 60% em todas as concentrações testadas, sendo os mesmos extratos de *O. majorana* L. e *R. officinalis* L. poucos citotóxicos. No entanto, o extrato hidroalcoólico de *O. vulgare* L. apresentou baixa toxicidade em relação aos mesmos extratos de *R. officinalis* L. e *O. majorana* L. nas concentrações de 0.078 a 2.5 mg/mL. O estudo é promissor pelo pioneirismo, já que não há trabalhos com estes tipos de extratos, merecendo maiores investigações destas plantas para o tratamento da esporotricose.

Palavras-chave: *Origanum vulgare* L.; *Origanum majorana* L.; *Rosmarinus officinalis* L.; infusão; decocção; esporotricose; resistência antifúngica.

RÉSUMÉ

La résistance antifongique observé dans les champignons du le Complexe de *Sporothrix schenckii* a encouragé la recherche de thérapies alternatives pour le traitement de sporotrichose. L'activité antimicrobienne des huiles essentielles de plantes de la famille Lamiaceae est connu, cependant, il existe peu d'études dans ces plantes sous forme d'extraits aqueux, qui sont avantageux pour la facilité d'utilisation par la population et en raison de rendement plus éléve. Le but de ce travail était d'évaluer pour la première fois l'activité anti-*Sporothrix* spp. de las préparation d'infusions à 10 et 60 minutes, décoction et des extraits hydroalcooliques de *Origanum vulgare* L. (origan); *O. majorana* L. (marjolaine) et *Rosmarinus officinalis* L. (romarin) contre les isolats cliniques de chats et de chiens avec sporotrichose, aussi bien que examiner l'activité cytotoxique de ces produits. Le tests de susceptibilité a été effectué par la technique de microdilution en bouillon (CLSI M38A2) et les résultats ont été exprimés en concentration minimale inhibitrice (CMI) e concentration minimale fongicide (CMF). Tous les extraits d'origan ont montré une fort activité anti-*Sporothrix* spp. (CMI_{50}: 5 mg/mL); CMF_{50}: 40 mg/mL). Em la marjolaine, extrait alcoolique montré CMI_{50} e CMF_{50} du 40 mg/mL, mais les autres extraits ont montré une faible activité, ainsi des extraits de romarin (CMI_{50}/ CMF_{50}>40mg/mL). Par les essais MTT en les cellules VERO, la proportion directe entre la toxicité et la concentration des extraits. La infusion à 10 minutes e la décoction d'*Origanum vulgare* L. ont montré une toxicité élevée que 70% des cellules en la concentration de 1.25 mg/mL, alors que la infusion à 60 minutes a montré une toxicité cellulaire supérieure à 60% pour tous les concentrations testées, et les mêmes extraits d'*O. majorana* L. et *R. officinalis* L. étaient peu cytotoxique. Cependant, l'extrait hydroalcoolique de *O. vulgare* L. a montré une faible toxicité par rapport aux mêmes extraits de *R. officinalis* L. et *O. majorana* L. entre des concentrations de 0.078 à 2.5 mg/mL. L'étude est prometteur par être pionnier, parce qu'il n'y a pas de recherche sur ces types de extraits, qui méritent une enquête plus approfondie de ces plantes pour le traitement se sporotrichose.

Mots-clés: *Origanum vulgare* L.; *Origanum majorana* L.; *Rosmarinus officinalis* L.; infusion; décoction; sporotrichose; résistance antifongique.

Introdução

A esporotricose é uma infecção granulomatosa subaguda ou crônica de ocorrência mundial, que acomete humanos e animais domésticos, principalmente felinos, havendo crescentes relatos em caninos [9,13,34,36,59]. A enfermidade é causada pelos fungos patogênicos *Sporothrix schenckii, S. globosa, S. mexicana, S. albicans* e *S. brasiliensis* [37-39], sendo esta última espécie considerada prevalente nos surtos de esporotricose felina no Brasil [46,55].

Em medicina veterinária, os antifúngicos iodeto de potássio, cetoconazol, anfotericina B e itraconazol são largamente utilizados, sendo este último considerado o fármaco de eleição na esporotricose felina e canina por apresentar resultados satisfatórios com menos efeitos adversos em relação aos demais antifúngicos [24,33,36,54,64].

Entretanto, o uso indiscriminado de medicamentos antifúngicos e as falhas na manutenção do manejo terapêutico pelos proprietários têm provocado o surgimento de cepas resistentes de *Sporothrix* spp., dificultando a remissão da enfermidade e possibilitando a disseminação do agente [14,37,55,60]. Diante deste fato, recorre-se ao estudo de alternativas terapêuticas para a esporotricose, sendo o uso de plantas medicinais considerado promissor, devido aos resultados satisfatórios *in vitro* e *in vivo* obtidos com diferentes espécies vegetais [18,29-30,32,41-42,64].

A fitoterapia tem recebido atenção na saúde humana e animal, a qual tem sido introduzida como alternativa terapêutica a diversas enfermidades [15] e que, dentre as plantas medicinais, orégano (*Origanum vulgare* L.), manjerona (*O. majorana* L.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) são plantas herbáceas e aromáticas pertencentes à família Lamiaceae, com diversas propriedades atribuídas a seus óleos essenciais, incluindo anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiviral e antifúngica [8,11-12,16-17,20,28,32,47-48,51,58,61,67-69]. Escassos estudos têm relatado a eficácia *in vitro* de óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* L. [32] e de *Origanum vulgare* L. [17-18] sobre *Sporothrix* spp. isolado de humanos e felinos doentes, não tendo sido divulgado trabalhos com *Origanum majorana* L. na esporotricose.

No Brasil, uma parte da população apresenta baixo acesso a medicamentos, tornando o uso de extratos aquosos vantajoso para a prática terapêutica, devido à

facilidade de obtenção dos mesmos e por apresentarem baixo custo [16,23,71]. Na forma de extratos aquosos, estudos *in vitro* comprovaram a atividade antimicrobiana destas plantas da família Lamiaceae nas formas de infusão, decocção e hidroalcoólicos contra diversos patógenos [2,7,56,66], os quais podem ser utilizados para fins medicinais e evitar os efeitos tóxicos que podem ser ocasionados pelo uso de óleos essenciais das mesmas plantas [40]. No entanto, não há estudos divulgados sobre a atividade antimicrobiana de extratos de plantas da família Lamiaceae sobre fungos causadores da esporotricose, embora já exista estudo comprovando a eficácia dos extratos hidroalcoólicos e tinturas de *O. vulgare* L. e *R. officinalis* L. como desinfetantes de superfícies contaminadas, sendo eficazes na sua eliminação [43].

Este trabalho objetivou avaliar a atividade anti-*Sporothrix* spp. de extratos aquosos e hidroalcoólicos de *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L. sobre isolados clínicos felinos e caninos do Complexo *Sporothrix schenckii*, bem como avaliar a atividade citotóxica destes extratos em células mamíferas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material Vegetal

Partes aéreas de orégano (*Origanum vulgare* L. – Lote 002/2013), manjerona (*Origanum majorana* L. – Lote 001/2014) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L. – Lote 002/2014) foram adquiridos comercialmente (Luar Sul®, Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda, Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) com registro de controle de qualidade.

Preparo dos Extratos

Os extratos aquosos de infusão foram preparados a 10% utilizando o material vegetal submerso em água destilada estéril fervente e mantida em temperatura ambiente por 10 minutos (INF_{10}) e 60 minutos (INF_{60}), a fim de se avaliar a influência do tempo de infusão sobre a atividade dos extratos. Para o preparo da decocção, as amostras das plantas foram adicionadas de água destilada estéril, submetidas ao aquecimento por 10 minutos. Após as misturas foram filtradas em papel-filtro para eliminar resíduos sólidos.

Para obtenção dos extratos hidroalcoólicos, o material vegetal foi acondicionado em água destilada estéril e preparado em tintura de álcool de cereais a 70% por 7 dias com agitações diárias, sendo posteriormente filtrada em gaze estéril. O extrato obtido foi evaporado sobre pressão em equipamento rotaevaporador e seu volume inicial restituído com água destilada estéril.

Atividade Citotóxica

A atividade citotóxica foi realizadas através do ensaio MTT em células mamíferas do tipo VERO. As células foram crescidas em meio RPMI-1640 suplementado com L-glutamina e isento de bicarbonato de sódio (pH 7.2), com adição de penicilina-estreptomicina e anfotericina B à atmosfera úmida de CO_2 a 5% e à temperatura de 37ºC. Após o crescimento celular, tripsina foi adicionada ao cultivo, e as células foram ressuspensas em RMPI-1640, resultando em aproximadamente $2x10^5$ células/mL. Alíquotas das suspensões celulares foram transferidas para poços individuais de microplaca de 96 poços, exceto no primeiro poço. As células foram incubadas em meio RPMI-1640 suplementada de soro fetal bovino a 10% em CO_2 a 5% por 24 horas à 37ºC. Subsequentemente, 100 µL de cada extrato em concentrações sucessivas em escala logarítmica, foram adicionadas às microplacas. Concentrações de 5 a 0.078 mg/mL diluídos em RPMI-1640 foram testados em triplicata por 48 horas a 37ºC em atmosfera úmida de CO_2 a 5%. Ao controle negativo, utilizou-se somente RPMI-1640. Para avaliação do resultado, 50 µL de solução de MTT – *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5 diphenyl tetrazolium bromide* – (2.5 mg/mL) foi adicionada em cada poço e a microplaca foi incubada por 2 horas e 30 minutos a 37ºC em atmosfera úmida de CO_2 a 5%. Após remover a solução MTT, 50 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) foi adicionada em cada poço, sendo agitado gentilmente por 5 minutos. As amostras foram mensuradas em uma leitora de microplaca em espectofotômetro de comprimento de onda de 540 nm. Com auxílio de microscópio invertido, foi avaliada a aparência das células. Os resultados foram expressos por porcentagem de inibição relativa ao controle de células, considerado este 100%.

Isolados Clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii*

Para a atividade antifúngica, foram utilizados isolados clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii* oriundos de caninos (*n*: 20) e felinos (*n*: 20) com esporotricose. Os isolados encontram-se estocados na micoteca do Centro de Pesquisa e Diagnóstico em

Micologia Veterinária (Universidade Federal de Pelotas, UFPEL, Pelotas/RS, Brasil). O isolamento fúngico ocorreu a partir da semeadura de amostras de lesões suspeitas em placas contendo ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) acrescido de Cloranfenicol e em ágar Mycosel® (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e estocadas a 27ºC e 35ºC para confirmação do dimorfismo típico, sendo posteriormente identificada as características macromorfológicos e micromorfológicas das colônias , sendo que cepa padrão de *S*. *schenckii* (IOC 1226) também foi utilizada (*n*: 1) nos testes.

Teste de Suscetibilidade Anti-*Sporothrix* spp.

Os testes *in vitro* foram realizados através da técnica de Microdiluição em Caldo de acordo com as diretrizes do documento M38-A2, recomendados pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI [19]. Subculturas individuais de *Sporothrix* spp, em ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) acrescido de Cloranfenicol a 27 °C por sete dias foram realizadas, sendo as colônias cobertas com 2 mL de solução salina contendo Tween 20 e raspadas com auxílio de lâmina de bisturi estéril. O conteúdo foi transferido para tubo estéril e mantida em descanso por 5 minutos para deposição das partículas O sobrenadante foi transferido para tubo contendo solução salina estéril, homogeneizado em agitador por 15 segundos, e ajustadas em densidade óptica de 80-82% em espectofotômetro com comprimento de onda de 530 nm (Spectrum Instruments Co., Shanghai, China). As suspensões dos inóculos foram diluídas em meio RPMI-1640 acrescido de tampão MOPS (1:50) para obtenção do inóculo final de aproximadamente $5x10^4$ UFC/mL. Em microplaca de 96 poços contendo 100 µL de RPMI-MOPS, foram adicionados 100 µL dos extratos e realizada a diluição sucessiva para obtenção das concentrações de 40 a 0.07 mg/mL, sendo acrescentado, em seguida, 100 µL dos inóculos, incluindo no controle positivo. Ao controle negativo, foi acrescentado 100 µL dos extratos para confirmar esterilidade. Itraconazol (Cepav Pharma Ltda., São Paulo, Brasil) foi preparado em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluído em RPMI-1640 contendo MOPS (Sigma, Steinheim, Alemanha) para obtenção das concentrações de 64 a 0.125 µg/mL. As microplacas foram incubadas a 27ºC por 72 horas, e a concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada visualmente através da comparação com o controle com crescimento fúngico e isento de fitoterápico, sendo definida como a menor concentração do produto capaz de inibir o crescimento fúngico. Para determinar a concentração fungicida mínima (CFM),

alíquotas de 10 μL de cada poço contendo crescimento fúngico foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Sabouraud-dextrose (Acumedia, Lansing, Michigan, EUA) e incubadas a 27ºC por 72 horas, sendo definida como a menor concentração capaz de eliminar o crescimento fúngico. Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

Análise Estatística.

A análise estatística foram realizados através da análise de variância e comparação das médias geométricas dos dados de acordo com o teste de Tukey através do *software* estatístico BioEstat® na versão 5.3 e o valor $p<0.05$ considerado de significância.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atividade Citotóxica

Estudos dos efeitos tóxicos de orégano, manjerona e alecrim sobre células mamíferas são escassos, principalmente utilizando extratos aquosos, como infusão e decocção [6,10], ficando as avaliações concentradas em seus óleos essenciais [18,22,26,57]. Os resultados da atividade citotóxica demonstraram que os extratos apresentaram graus de citoxicidade diretamente proporcional às concentrações testadas de cada produto, sendo a infusão a 60 minutos de *O. vulgare* L. o extrato mais citotóxico dentre os testados, com grau de viabilidade celular inferior a 30%.

Todos os extratos de *O. vulgare* L. foram citotóxicos à concentração de 5 mg/mL com grau de viabilidade celular menor que 25%. À menor concentração (0.078 mg/mL), somente a infusão a 60 minutos apresentou citotoxicidade de 69%, diferindo estatiscamente dos demais extratos ($p<0.01$), que foram tóxicos para menos de 5% das células (Figura 1). Nossos dados são similares aos encontrados por Al-Kalaldeh et al. [4], que demonstraram ausência de citotoxicidade em extratos etanólicos de *O. vulgare* L. nas concentrações de 0.1 a 100 μg/mL. No entanto, as infusões e a decocção de orégano foram tóxicas em mais de 70% das células a partir da concentração de 1.25 mg/mL. Entretanto, salienta-se que nosso estudo foi realizado *in vitro* e que, segundo Nogueira e Andrade [49], as células mamíferas em testes MTT são mais suscetíveis em

comparação aos testes *in vivo*, devido à exposição direta do produto, ao passo que *in vivo*, o produto sofre influência de diversas ações externas, como influência do pH gástrico e metabolização hepática renal, entre outras.

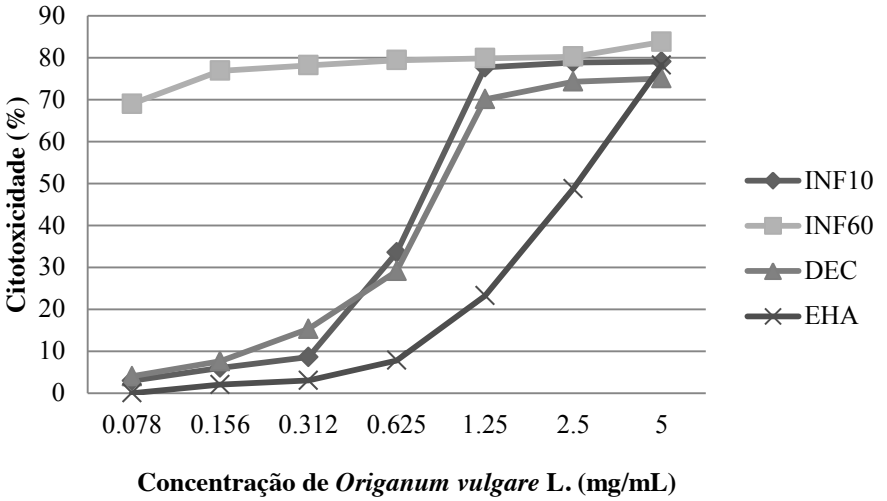

Figura 1 Toxicidade celular (%) *in vitro* de extratos aquosos de infusão a 10 (INF10) e 60 (INF60) minutos, decocção (DEC) e extrato hidroalcoólico (EHA) de *Origanum vulgare* L.
Toxicité cellulaire (%) in vitro *d'extraits aqueuse d'infusion à 10 (INF10) et 60 minutes (INF60), décoction (DEC) et de l'extrait hydroalcoolique (EHA) d'*Origanum vulgare *L.*

Os extratos de *O. majorana* L. apresentaram citotoxicidade inferior a 50% para todas as concentrações testadas, sendo a sua decocção com menor atividade tóxica à 5 mg/mL dentre os demais extratos da planta ($p<0.01$). Na menor concentração testada, todos os extratos apresentaram baixo potencial citotóxico (inferior à 3%), exceto o extrato hidroalcoólico com toxicidade de 15% às células (Figura 2) e diferindo estatisticamente dos demais produtos testados ($p<0.01$). Em corroboração ao nosso estudo, Al-Harbi et al. [3] demonstraram que o extrato etanólico de *O. majorana* L. apresentou baixa atividade citotóxica, com a dose mínima efetiva de 125 mg/kg. Ainda, El-Ashmawy et al. [21] demonstraram que ratos induzidos à toxicidade hepática e renal com acetato de chumbo e tratados oralmente com extratos aquosos e alcoólicos de *O. majorana* L. a 10% durante 30 dias não apresentaram lesões hepáticas, como congestão, edema, reações celular ou degeneração e necrose, e, ainda, apresentaram declínio nos níveis de enzimas transaminases (aspartatos aminotransferase – AST, alanina aminostransferase – ALT), fosfatase alcalina, uréia e creatinina, sendo sugerido que os extratos poderia melhorar as funções hepáticas e renais.

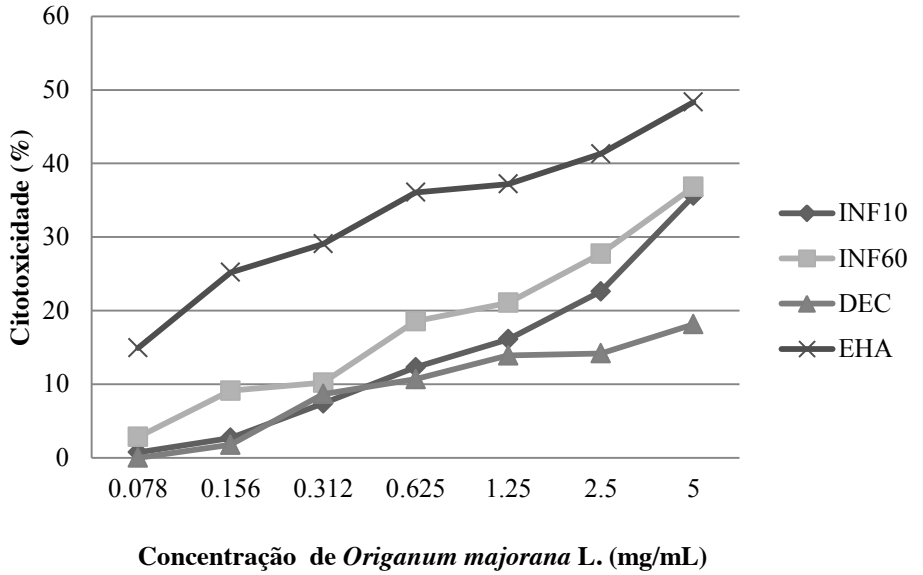

Figura 2 Toxicidade celular (%) *in vitro* de extratos aquosos de infusão a 10 (INF10) e 60 (INF60) minutos, decocção (DEC) e extrato hidroalcoólico (EHA) de *Origanum majorana* L.
Toxicité cellulaire (%) in vitro *d'extraits aqueuse d'infusion à 10 (INF10) et 60 minutes (INF60), décoction (DEC) et de l'extrait hydroalcoolique (EHA) d'*Origanum majorana *L.*

Em *R. officinalis* L., todos os extratos apresentaram baixa atividade citotóxica à 0.078 mg/mL (inferior à 10%), entretanto, a infusão a 60 minutos apresentou maior toxicidade dentre os demais (65%), ao passo que a infusão a 10 minutos de alecrim apresentou porcentual de toxicidade inferior à 30%, diferindo estatiscamente dos demais ($p<0.01$), conforme Figura 3. O decréscimo na viabilidade celular conforme o aumento da concentração dos extratos de alecrim estão em acordo com os poucos estudos divulgados [6,10]. Em células de rim de gatos (CRFK), a concentração de 330 μg/mL (0.33 mg/mL) manteve a viabilidade celular de 86% [6], corroborando com nossos estudos, o qual todos os extratos aquosos mantiveram a viabilidade das células VERO em concentração próxima (0.312 mg/mL) entre 86% a 93%. O extrato etanólico de alecrim nas concentrações de 12.5 a 25 μg/mL também foi atóxico para células CRFK [10]. Devido à toxicidade dos extratos serem diretamente proporcional às concentrações, valores inferiores à menor concentração testada (0.078 mg/mL) tendem a apresentar menor atividade tóxica sobre as células, conforme o estudo de Blank et al. [10]. Entretanto, o grau de toxicidade dos extratos depende de diversos fatores, como a dose utilizada e a frequência de administração [70], bem como ao tempo de contato da planta com o solvente ou líquido extratos, os quais influenciam nas atividades antifúngicas e citotóxicas, uma vez que apresentaram resultados distintos nas infusões preparadas em 10 e 60 minutos.

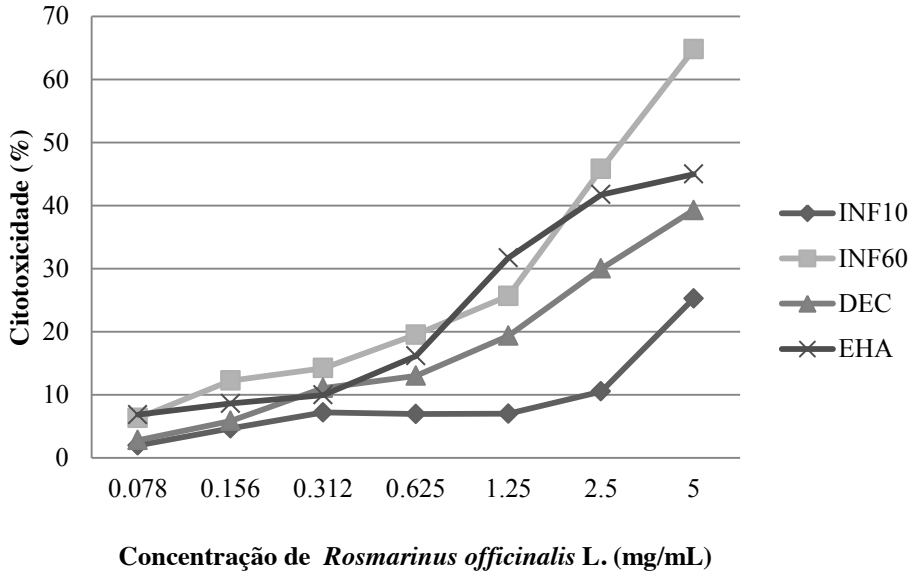

Figura 3 Toxicidade celular (%) *in vitro* de extratos aquosos de infusão a 10 (INF10) e 60 (INF60) minutos, decocção (DEC) e extrato hidroalcoólico (EHA) de *Rosmarinus officinalis* L.
Toxicité cellulaire (%) in vitro *d'extraits aqueuse d'infusion à 10 (INF10) et 60 minutes (INF60), décoction (DEC) et de l'extrait hydroalcoolique (EHA) de* Rosmarinus officinalis *L.*

De forma geral, observou-se que os diferentes extratos de manjerona apresentou menor potencial citotóxico em relação aos extratos das demais plantas da família Lamiaceae à 5000 μg/mL, diferindo estatisticamente de todos os extratos de *O. vulgare* L. e da infusão a 60 minutos e decocção de *R. officinalis* L. (Tabela 1).

Tabela 1 Toxicidade celular (%) à 5 mg/mL dos extratos de *Origanum vulgare* L., *Origanum majorana* L. e *Rosmarinus officinalis* L.
*Toxicité cellulaire (%) à 5 mg/mL d'extraits d'*Origanum vulgare *L.*, Origanum majorana *L.*, *et* Rosmarinus officinalis *L.*

Espécies botânicas da família Lamiaceae	INF10	INF60	DEC	EHA
Origanum vulgare L.	79^{Abc}	83.7^{Aa}	75^{Ad}	78.2^{Acd}
Origanum majorana L.	35.6^{Bc}	36.8^{Cc}	18.1^{Cd}	48.3^{Bb}
Rosmarinus officinalis L.	25.2^{Bd}	64.7^{Bb}	39.2^{Bcd}	44.9^{Bc}

INF10 – infusão a 10 minutos; INF60 – infusão a 60 minutos; DEC – decocção; EHA – extrato hidroalcoólico.
Diferentes letras maiúsculas (na coluna) e diferentes letras minúsculas (na linha) expressam diferenças significativas uma da outra ($p<0.01$).
INF 10 – infusion à 10 minutes; INF 60 – infusion à 60 minutes; DEC – décoction; EHA – extrait hydroalcoolique.
Différent majuscules (colonne) et différentes lettres minuscules (en ligne) exprimant différents significatives entre elles ($p<0.01$)

Atividade Anti-*Sporothrix* spp.

Os valores das CIM e CFM dos extratos sobre isolados do Complexo *Sporothrix schenckii* estão na Tabela 2.

Pela primeira vez, extratos aquosos e hidroalcoólicos das três plantas selecionadas da família Lamiaceae foram testadas contra *Sporothrix* spp. e os resultados demonstraram que todos os extratos de *O*. *vulgare* L. apresentaram forte atividade inibitória, diferindo estatiscamente dos extratos de *R*. *officinalis* L. e *O*. *majorana* L. ($p<0.05$).

Os isolados de *Sporothrix* spp. foram sensíveis às infusões de *O*. *vulgare* L. na CIM_{50} de 5 mg/mL para ambos tipos e CIM_{90} de 10 mg/mL e 20 mg/mL, respectivamente, para as infusões preparadas em 10 e em 60 minutos, demonstrando não haver influência do tempo de preparo na atividade anti-*Sporothrix* spp. ($p>0.05$). Para a decocção e o extrato hidroalcoólico do orégano, os isolados de *Sporothrix* spp. foram sensíveis nas CIM_{50} de 5 mg/mL para ambos extratos e CIM_{90} de 20 mg/mL e 10 mg/mL, respectivamente. Na literatura, os estudos da atividade anti-*Sporothrix* spp. das plantas da família Lamiaceae concentram-se em seus óleos essenciais. Isolados clínicos leveduriformes de esporotricose felina e humana foram sensíveis ao óleo essencial de *O*. *vulgare* L. na CIM de 250 µL/mL [18] e em isolados animais na CIM média de 350 µL/mL [17], demonstrando potencial atividade do orégano, como evidenciado no presente estudo. A atividade antifúngica destes óleos é atribuída à presença de compostos fenólicos, como timol e carvacrol [17], entretanto, os mesmos encontram-se ausentes nos extratos aquosos de orégano, sendo a atividade antifúngica destes relacionada à elevada composição de ácidos fenólicos e flavonóides, especialmente ácido rosmarínico, luteolinas 7-*O*-glicosídeo e 7-*O*-glucuronida e apinenina 7-*O*-glucuronida, os quais variam quantitativamente entre os extratos preparados de plantas coletadas em diferentes regiões [40].

Tabela 2 Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) de diferentes extratos plantas selecionadas da família Lamiaceae contra isolados clínicos do Complexo *Sporothrix schenckii* de oriundos de caninos e felinos.
Concentration minimale inhibitrice (CMI) et la concentration fongicide minimale (MFC) de différents extraits de plantes de la famille Lamiaceae contre des isolats cliniques de Complexe Sporothrix schenckii *des chiens et des chats*.

Família Lamiaceae	**Tipo de Extrato**		**Felinos (*n*: 20)**			**Caninos (*n*: 20)**			**IOC 1226 (*n*: 1)**	**Todos (*n*: 41)**		
			Variação	**50%**	**90%**	**Variação**	**50%**	**90%**		**Variação**	**50%**	**90%**
Origanum vulgare L. (mg/mL)	INF10	CIM	0,31–>40	2,5	10	0,62–20	5	10	1,25	0,31 - >40	5	10
		CFM	5–>40	40	>40	20–40	40	40	20	5 - >40	40	40
	INF60	CIM	0,62–10	5	20	1,25–20	5	20	1,25	0,62 – 20	5	20
		CFM	5–>40	20	>40	10– >40	>40	>40	>40	5 - >40	40	>40
	DEC	CIM	0,31–40	2,5	20	≤0,07 – 10	5	10	2,5	≤0,07–>40	5	20
		CFM	0,62–>40	20	>40	≤0,07– >40	40	>40	2,5	≤0,07– >40	40	>40
	EHA	CIM	≤0,07–20	5	10	≤0,07– 10	5	10	≤0,07	≤0,07 – 20	5	10
		CFM	0,15–>40	40	>40	≤0,07– >40	40	>40	≤0,07	≤0,07– >40	40	>40
Rosmarinus officinalis L. (mg/mL)	INF10	CIM	>40	>40	>40	10– >40	>40	>40	>40	10 - >40	>40	>40
		CFM	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	INF60	CIM	>40	>40	>40	0,62 - >40	>40	>40	>40	0,62 - >40	>40	>40
		CFM	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	DEC	CIM	1,25–>40	>40	>40	0,31 - >40	>40	>40	>40	0,31 - >40	>40	>40
		CFM	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	EHA	CIM	≤0,07–>40	>40	>40	0,31 - >40	>40	>40	>40	≤0,07– >40	>40	>40
		CFM	1,25–>40	>40	>40	5 - >40	>40	>40	>40	1,25 - >40	>40	>40
Origanum majorana L. (mg/mL)	INF10	CIM	0,62–>40	>40	>40	0,62 - >40	>40	>40	>40	0,62 - >40	>40	>40
		CFM	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	INF60	CIM	0,31–>40	>40	>40	1,25 - >40	>40	>40	5	0,31 - >40	>40	>40
		CFM	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40	>40
	DEC	CIM	0,15–>40	>40	>40	0,15 - >40	>40	>40	0,31	0,15 - >40	>40	>40
		CFM	2,5–>40	>40	>40	2,5 - >40	>40	>40	2,5	2,5 - >40	>40	>40
	EHA	CIM	≤0,07 – 40	40	40	≤0,07- 40	20	40	0,31	≤0,07– >40	40	40
		CFM	0,62 – >40	>40	>40	0,62 - >40	>40	>40	1,25	0,62 - >40	>40	>40
Itraconazole (µg/mL)		CIM	≤0,12– >64	2	>64	≤0,12– >64	1	64	≤0,12	≤0,12– >64	2	>64
		CFM	32 - >64	>64	>64	32 - >64	>64	>64	>64	32 - >64	>64	>64

*INF10 – infusão a 10 minutos; INF60 – infusão a 60 minutos; DEC – decocção; EHA – extrato hidroalcoólico.
**INF 10 – infusion à 10 minutes; INF 60 – infusion à 60 minutes; DEC – décoction; EHA – extrait hydroalcoolique*

Os poucos estudos existentes com extratos aquosos e hidroalcoólicos também demonstraram a atividade antimicrobiana contra outros agentes patogênicos. Infusão, decocção e extrato hidroalcoólico de orégano a 20 mg/mL foram efetivos *in vitro* contra *Staphylococcus* sp., *Pseudomonas aeruginosa, Enterobacter* sp. e *Proteus vulgaris*, sendo *E. coli* altamente suscetível ao extrato hidroalcoólico [40]. Entretanto, Saeed e Tariq [56] não encontraram atividade antibacteriana da decocção de orégano contra *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* spp. e *Bacillus* spp., mas demonstraram que essas bactérias foram sensíveis à infusão de orégano promovendo inibição de até 17.5 mm de diâmetro. Em fungos oportunistas, *Aspergillus flavus, A. niger* e *A. pterus* foram sensíveis aos extratos metanólicos a 10% de orégano com zona de inibição entre 11 a 30 mm, sendo que o extrato aquoso na mesma concentração inibiu em 10 mm o crescimento somente de *A. flavus* e 9 mm de *A. niger* [7].

Para os extratos de *R. officinalis* L., os isolados felinos de *Sporothrix* spp. apresentaram resistência às concentrações testadas (CIM/CFM maior que 40 mg/mL), embora 5% (1/20) tenha sido sensível à decocção (CIM 1.25 mg/mL) e 20% (4/20) ao extrato hidroalcoólico (CIM entre ≤0.07 a 40 mg/mL). Em isolados caninos, as infusões a 10 e 60 minutos apresentaram atividade inibitória em 5% destes (10 mg/mL e 0.62 mg/mL, respectivamente), sem diferença estatística nos resultados ($p>0.05$). Na decocção, 30% (6/20) foram sensíveis nas CIM entre 0.31 a 10 mg/mL, enquanto que o extrato hidroalcoólico de alecrim inibiu 40% (8/20) dos isolados caninos nas CIM entre 0.31 a 40 mg/mL. O extrato hidroalcoólico de *R. officinalis* L. foi o único a apresentar atividade fungicida para 10% (2/20) dos isolados felinos (CFM de 1.25 a 10 mg/mL) e 25% (5/20) dos isolados caninos (CFM de 5 a 20 mg/mL). Entretanto, a CIM_{50} e CIM_{90} de todos os extratos para os isolados animais foi maior que 40 mg/mL, não havendo diferença estatística na sensibilidade dos isolados animais para os extratos de alecrim ($p>0.05$). Embora os extratos aquosos e hidroalcoólicos tenham apresentado fraca atividade anti-*Sporothrix* spp., o óleo essencial de *R. officinalis* L. tem apresentado atividade inibitória satisfatória à 11 mg/mL [32].

A sensibilidade de outros fungos patogênicos já foi observada em extratos etanólicos de *R. officinalis* L. contra *Candida albicans* e *Aspergillus niger* com zonas de inibição de 10.7 a 25 mm e 18.7 a 8.7 mm nas concentrações de 3 a 25 mg/poço [53]. A atividade antibacteriana já foi demonstrada em *Streptococcus sobrinus* na forma de extratos aquoso de infusão e extrato metanólico nas CIM de 16 e 4 mg/mL,

respectivamente [66], bem como contra *Salmonella* spp., *Pseudomonas* spp., *E. coli*, *Staphylococcus epidermidis, S. aureus, Klebsiella* spp., *Proteus* spp. entre 25 a 400 μg/mL na forma de extratos aquosos e alcoólicos [2].

Assim como a resistência observada em *Sporothrix* spp., Ahmed et al. [2] observaram que *Pseudomonas* sp. e *Escherichia coli* não foram sensíveis aos extratos testados. Ainda, extrato aquoso de *R. officinalis* L apresentou atividade antiviral contra *Herpes simplex* dos tipos 1 e 2, inclusive sobre cepas resistentes ao antiviral aciclovir [48]. A atividade antimicrobiana dos extratos aquosos de *R. officinalis* L. possivelmente está relacionada à composição rica em ácidos rosmarínico e carnósicos [5,27,46,50].

Assim como em *R. officinalis* L., a atividade fungistática e fungicida também foi fracamente observada nas infusões de *O. majorana* L. Em isolados felinos, 15% (3/20) foram sensíveis na CIM de 0.62 mg/mL e 25% (5/20) na CIM entre 0.31 a 20 mg/mL para as infusões a 10 e 60 minutos, respectivamente, não diferindo estatisticamente entre o tempo de preparo ($p>0.05$). A atividade fungicida não foi observada nas concentrações testadas de ambas as infusões de manjerona (CFM maior que 40 mg/mL). Na decocção, 30% (6/20) dos isolados felinos foram sensíveis na CIM entre 0.15 a 40 mg/mL, entretanto, somente 10% (2/20) foram sensíveis à CFM entre 2.5 a 5 mg/mL, sendo que estes isolados felinos eliminados pela decocção de manjerona foram altamente sensíveis a todos os extratos das plantas da família Lamiaceae. Todos os isolados felinos foram sensíveis ao extrato hidroalcoólico de *O. majorana* L., que diferiu estatiscamente das infusões da planta ($p<0.05$), cuja CIM_{50} e CIM_{90} foram de 40 mg/mL, entretanto, a $CFM_{50,90}$ foi maior que 40 mg/mL. Não houve diferença estatística nos resultados dos extratos entre os isolados animais ($p>0.05$).

Em isolados caninos, somente 10% (2/20) foram sensíveis às infusões de 10 e 60 minutos nas CIM de 0.62 mg/mL e entre 1.25 a 10 mg/mL, respectivamente; 35% (7/20) à decocção nas CIM 0.15 a 40 mg/mL e, assim como ocorreu nos isolados felinos, extrato hidroalcoólico apresentou atividade inibitória sobre todos os isolados de caninos (100%), embora somente 25% (5/20) tenham sido sensíveis na CFM entre 0.62 a 5 mg/mL. Comparando a sensibilidade dos isolados clínicos de felinos com caninos, não houve diferença estatística para os diferentes extratos de *O. majorana* L.

Embora escassos os estudos com *O. majorana* L., alguns estudos tem demonstrado a atividade inibitória do extrato etanólico sobre o crescimento de

Penicillium cyclopium e *Aspergillus niger* na concentração de 2.5% [67]. Outros fungos também demonstraram sensibilidade ao extrato metanólico de manjerona, como *Candida albicans, Aspergillus niger, A. parasiticus* e *Rhizopus oryzae* [31]. Em patógenos resistentes a antimicrobianos, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia* resistentes a diferentes antibióticos demonstraram sensibilidade aos extratos aquosos de *O. majorana* L. nas concentrações de 20 a 80 μg/mL, os quais também foram sensíveis aos extratos de *R. officinalis* L. entre 5 a 80 μg/mL [1].

O tratamento convencional da esporotricose é realizado com o fármaco de eleição itraconazol [34,55]. Para os testes *in vitro*, as diretrizes do CLSI recomendam que as concentrações do itraconazol sejam testadas entre 0.0313 a 16 μg/mL, entretanto, os testes-piloto demonstraram alta resistência dos isolados clínicos de *Sporothrix* spp. utilizados no estudo à concentração máxima testada, o que nos instigou a aumentar as concentrações testadas a partir de 0.125 a 64 μg/mL. Embora itraconazol tenha apresentado atividade inibitória eficaz contra *Sporothrix* ssp. na CIM_{50} de 2 μg/mL, a CIM_{90} foi maior que 64 μg/mL com resistência em 15% (3/20) dos isolados felinos e 10% (2/20) dos caninos.

Interessantemente, os mesmos isolados resistentes às concentrações inibitória do itraconazol apresentaram-se sensíveis ao extrato hidroalcoólico de *O. majorana* L. (CIM entre 0.31 a 40 mg/mL) e a todos os extratos aquosos e hidroalcoólico de *O. vulgare* L. (CIM de ≤0.07 a 20 mg/mL), que também apresentaram atividade fungicida (CFM de ≤0.07 a maior que 40 mg/mL). Por sua vez, nenhum extrato de *R. officinalis* L. apresentou atividade sobre estes isolados resistentes ao itraconazol. Sabe-se que *Sporothrix* spp. apresenta parede celular rígida composta de glucanas, mananas, quitina, proteínas e lipídeos que conferem rigidez à célula e proteção contra substâncias externas, além de outros fatores de patogenicidade, como capacidade de melanização e termotolerância [35,44]. Sugere-se que o mecanismo de ação dos extratos das plantas testadas se dê por atuação direta sobre a parede celular fúngica, provocando ruptura da membrana plasmática, granulação citoplasmática e desorganização dos conteúdos celulares, bem como possa atuar diretamente sobre as enzimas fúngicas, inibindo-as [25,62].

Em relação à atividade fungicida, itraconazol apresentou fraca eficiência *in vitro*, com somente 10% (2/20) dos isolados felinos sensíveis à CFM de 32 µg/mL e 20% (4/20) dos caninos entre 32 a 64 µg/mL. A suscetibilidades destes isolados resistentes à CFM do itraconazol diferiram estatiscamente dos resultados de *O. vulgare* L. ($p<0.05$), que apresentou forte atividade anti-*Sporothrix* spp.

A resistência observada nos fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* ao itraconazol corroboram com os estudos de Marimon et al. [37] e Rodrigues et al. [55] sobre *S. schenckii*, *S. brasiliensis*, *S. globosa* e *S. mexicana* oriundos de humanos e animais em diferentes regiões do mundo, o que reforça a necessidade de maiores estudos para o seu controle e tratamento. O surgimento da resistência antifúngica resulta de diversos fatores, principalmente do uso incorreto dos fármacos, devido à dificuldade do manejo terapêutico pelos proprietários de animais, como tempo prolongado, custo elevado e dificuldade na administração oral em cães e, principalmente, em gatos, ocorrendo frequentes casos de abandono à terapia sem o controle do médico veterinário [14]. A situação atual da resistência antifúngica observada, torna o controle da esporotricose mais preocupante no cenário médico veterinário e médico humano, uma vez que a doença apresenta potencial zoonótico de ocorrência mundial com frequentes surtos no Brasil [34,46,55].

Assim como demonstrado em nossos dados, extratos de outras espécies botânicas também têm apresentado atividade sobre patógenos resistentes a antimicrobianos. Extratos metanólicos de plantas da família Asteraceae, como *Pterocaulon polystachyum*, *P. lorentzii*, *P. lanatum*, entre outros, também apresentaram atividade contra *Sporothrix* spp. resistentes ao itraconazol, nas concentrações de 5000 a 156 µg/mL [63]. Em outros patógenos, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumonia* resistentes a diferentes antibióticos demonstraram sensibilidade aos extratos aquosos de *O. majorana* L. e *R. officinalis* L. [1]. Diante deste fato, torna-se necessário explorar os estudos com plantas medicinais, especialmente com extratos aquosos e hidroalcoólicos de plantas da família Lamiaceae, por serem promissores para o tratamento da esporotricose.

CONCLUSÃO

Dentre os extratos testados das três plantas da família Lamiaceae, *O. vulgare* L. apresentou melhor atividade anti-*Sporothrix* spp. em comparação aos extratos de *O. majorana* L. e *R. officinalis* L., que por sua vez, apresentaram menor atividade citotóxica. Os resultados foram promissores e incentivam maiores investigações com as plantas para o tratamento da esporotricose.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao CNPq, CAPES e FAPERGS.

REFERÊNCIAS

[1] Abdel-Massih R, Abdou E, Baydoun E, Daoud Z. Antibacterial activity of the extracts obtained from *Rosmarinus officinalis*, *Origanum majorana* and *Trigonella foenum-graecum* on highly drug-resistant Gram negative bacilli. J Bot 2010, article ID 464087, 8 pages.

[2] Ahmed SO, Ibrahim TZ, Yonan MA. Study the effect of aqueous and alcoholic extracts of some spices on some pathogenic bacteria in different media. J Tikrit Univ Agric Sci 2012, 12:1-11.

[3] Al-Harbi N.O. Effect of marjoram extract treatment on the cytological and biochemical changes induced by cyclophosphamide in mice. J Med Plants Res 2011, 5:5479-85.

[4] Al-Kaladeh JZ, Abu-Dahab R, Afifi FU. Volatile oil composition and antiproliferative activity of *Laurus nobilis*, *Origanum syriacum* and *Salvia triloba* against human breast adenocarcinoma cells. Nutr Res 2010, 30:271-278.

[5] Almela L, Sánchez-Munoz B, Fernández-López JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatograpic–mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. J Chromatogr A 2006, 1120:221–9.

[6] Alves GH, Bank DE, Cleff MB, Hübner SO, Freitag RA. Extrato aquoso de Alecrim: Deteriminação da Concentração Atóxica em Células de Rim de Gato. In: Anais de Eventos do XIII ENPOS; 2011; Pelotas/RS, Brasil.

[7] Ashraf Z, Muhammad A, Imran M, Tareq AH. *In vitro* antibacterial and antifungal activity of methanol, chloroform and aqueous extracts of *Origanum vulgare* and their comparative analysis. Int J Organ Chem 2011, 1:257-61.

[8] Barreto HM, Silva-Filho EC, Lima EO, Coutinho HDM, Morais-Braga MFB, Tavares CCA, et al. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. Ind Crop Prod 2014, 59:290-4.

[9] Barros MBL, Schubach TMP, Coll JO, Gremião ID, Wanke B, Schubach A. Esporotricose: a evolução e os desafios de uma epidemia. Rev Panam Salud Publ 2010, 27:455-60.

[10] Blank DE, Alves GH, Hübner SO, Freitag RA, Cleff MB. Avaliação citotóxica do extrato etanólico de *Rosmarinus officinalis*. In: Anais de Eventos do XIII ENPOS; 2011; Pelotas/RS, Brasil.

[11] Bozin B, Mimica-Dukic N, Samojlik I, Jovin E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. J Agric Food Chem 2007, 55:7879-85.

[12] Busatta C, Vidal RS, Popiolski AS, Mossi AJ, Dariva C, Rodrigues MRA, et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as na antimicrobial agent in sausage. Food Microbiol 2008, 25:207-11.

[13] Cafarchia C, Sasanelli M, Lia RP, Caprariis D, Guillot J, Otranto D. Lymphocutaneous and nasal sporotrichosis in a dog from Southern Italy: case report. Mycopathologia 2007, 163:75-9.

[14] Chaves AR, Campos MP, Barros MBL, Carmo CN, Gremião IDF, Pereira AS et al. Treatment Abandonment in Feline Sporotrichosis – Study of 147 Cases. Zoonoses Public Health 2013, 60:149-53.

[15] Cleff MB, Giordani C, Santin R. Plantas Medicinais e Tóxicas em Pelotas, RS - Usos e Cuidados. 1ª edição, Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2012. 70p.

[16] Cleff MB, Meinerz ARM, Madrid IM, Fonseca AO, Alves HG, Meireles MCA, et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. Rev Bras Plantas Med 2012, 14:43-9.

[17] Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, et al. Inhibitory acitivy of *Origanum* essential oil against important fungus in veterinary. Arq Bras Med Vet Zootec 2010, 62:1291-4.

[18] Cleff MB, Meinerz ARM, Schuch LFD, Rodrigues MRA, Meireles MCA, Mello JRB. In vitro Activity of the Essential Oil of *Origanum vulgare* against *Sporothrix schenckii*. Arq Bras Med Vet Zootec 2008, 60:513-6.

[19] CLSI M38-A2. Clinical and Laboratory Standard Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous fungi. Approved Standard - Third Edition, 2008.

[20] Dorman HJD, Bachmayer O, Kosar M, Hiltunen R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. J Agric Food Chem 2004, 52:762-70.

[21] El-Ashmawy IM, El-Nahas A, Salama OM. Protective effect of volative oil, alcoholic and aqueous extracts of *Origanum majorana* on lead acetate toxicity in mice. Basic Clin Pharmacol Toxicol 2005, 97:238-43.

[22] Fonseca AO, Fischer G, Santin R, Rodrigues MRA, Meireles MCA, Cleff MB. Estudo da composição química, ação antifúngica e citotóxica do *Rosmarinnus officinalis* (alecrim) proveniente da região de Pelotas-RS. In: XXI Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais do Brasil; 2010; João Pessoa, Brasil.

[23] Furlan MR. Cultivo de plantas medicinais. 1ª edição, Cuiabá: SEBRAE, 1998. 137p.

[24] Gremião IDF, Schubach TMP, Pereira AS, Rodrigues AM, Chaves AR, Barros MBL. Intralesional amphotericin B in a cat with refractory localised sporotrichosis. J Feline Med Surg 2009, 11:720-3.

[25] Gupta S, Kulshreshth K, Datta A. Bio-control of clinical fungal isolates associated with fungal keratitis using medicinal plant extract. Int J Pharm Pharm Sci 2012, 4:544-547.

[26] Hollenbach CB. Estudo da toxicidade reprodutiva do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) em ratos Wistar [thesis]. Porto Alegre/RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

[27] Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. Food Chem 2011, 126:339–46.

[28] Jiang Y, Wu N, Wang W, Luo M, Zhao CJ, Zu YG, et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of rosemary. Environm Toxicol Pharmacol 2011, 32:63-8.

[29] Johann S, Mendes BG, Missau FC, Resende MA, Pizzolatti MG. Antifungal Activity of Five Species of Polygala. Braz J Microbiol 2011, 42:1065-75.

[30] Joshi S, Mishra D, Bisht G, Khetwal KS. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Lobelia pyramidalis* Wall. EXCLI J 2011, 10:274-9.

[31] Leeja L, Thoppil JE. Antimicrobial activity of methanol extract of *Origanum majorana* L. (sweet marjoram). J Environm Biol 2007, 28:145-6.

[32] Luqman S, Dwivedi GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. Alternat Ther 2007, 13:54-5.

[33] Madrid IM, Mattei AS, Fernandes CG, Nobre MO, Meireles MCA. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis / A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. Mycopathologia 2012, 173:265-73.

[34] Madrid IM, 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 Public Health 2010a, 57:151-4.

[35] Madrid IM, Mattei AS, Xavier MO, Guim TN, Fernandes CG, Nobre MO, Meireles MCA. Role of melanin in the pathogenesis of cutaneous sporotrichosis. Microb Infect 2010b, 1:162-165.

[36] Madrid IM, Santos Jr. R, Sampaio Jr. DP, Mueller EN, Dutra D, Nobre MO, et al. Esporotricose canina: relato de três casos. Acta Sci Vet 2007, 35:105-8.

[37] Marimon R, Serena C, Gené J, Cano J, Guarro J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix schenckii*. Antimicrob Agents Chemother 2008, 52:732-4.

[38] Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Kawasaki M, Guarro J. *Sporothrix brasiliens*is, *S. globosa*, and *S. mexicana*, Three New *Sporothrix* Species of Clinical Interest. J Clin Microbiol 2007, 45:3198-206.

[39] Marimon R, Gené J, Cano L, Trilles M, Santos L, Guarro J. Molecular phylogeny of *Sporothrix schenckii*. J Clin Microbiol 2006, 44:3251-6.

[40] Martins N, Barros L, Santos-Buelga C, Henriques M, Silva S, Ferreira ICFR. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. Food Chem 2014, 158:73-80.

[41] Masoko P, Picard J, Eloff JN. The Antifungal Activity of twenty-four Southern African *Combretum* species (Combretaceae). S Afr J Bot 2007, 73:173-83.

[42] Masoko P, Picard J, Eloff JN. Antifungal Activities of six South African *Terminalia* species (Combretaceae). J Ethnopharmacol 2005, 99:301-8.

[43] Matos CB. Eficácia de extratos vegetais na desinfecção de superfícies contaminadas com fungos do Complexo *Sporothrix* [dissertação]. 83f. Pelotas/RS: Universidade Federal de Pelotas, 2014.

[44] Meireles MCA, Nascente PS. Micologia Veterinária. 1ª edição, Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2009. 543p.

[45] Meziane-Assami D, Tomao V, Ruiz K, Meklati BY, Chemat F. Geographical differentiation of rosemary based on GC/MS and fast HPLC analyses. Food Anal Method 2013, 6:282-8.

[46] Montenegro H, Rodrigues A, Dias M, da Silva E, Bernardi F, Camargo ZP. Feline sporotrichosis due to *Sporothrix brasiliensis*: an emerging animal infection in São Paulo, Brazil. BMC Vet Res 2014, 10:269.

[47] Mugnaini L, Nardoni S, Pistelli L, Leonardi M, Giuliotti L, Bensenuti MN, et al. A herbal antifungal formulation of *Thymys serpillum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. Mycoses 2013, 56:333-7.

[48] Mugnaini L, Nardoni S, Pinto L, Pistelli L, Leonardi M, Pisseri F, et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils angainst feline isolates of *Microsporum canis*. J Mycol Méd 2012, 22:179-84.

[49] Nogueira RMB, Andrade SF. Manual de Toxicologia Veterinária. 1ª edição, Rio de Janeiro: Editora Roca, 2011.

[50] Nolkemper S, Reichling J, Stintzing FC, Carle R, Schnitzler P. Antiviral effect of aqueous extracts from species of Lamiaceae family against *Herpes simplex* virus type 1 and type 2 in vitro. Plant Med 2006, 72:1378-82.

[51] Nostro A, Blanco AR, Cannatelli MA, Enea V, Flamini G, Morelli I, et al. Susceptibility of methicillin-resistant Staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. FEMS Microbl Lett 2004, 230:191–5.

[52] Peshev D, Peeva LG, Peev G, Baptista IIR, Boam AT. Application of organic solvent nanofiltration for concentration of antioxidant extracts of rosemary (*Rosmarinus officinallis* L.). Chem Eng Res Des 2011, 89:318–27.

[53] Qabaha K.I. Antimicrobial and free radical scavenging activities of five Palestinian medicinal plants. Afr J Complement Altern Med 2013, 10:101-8.

[54] Reis RG, Gremião ID, Kitada AA, Rocha RF, Castro VS, Barros MB, Menezes RC, et al. Potassium iodide capsule treatment of feline sporotrichosis. J Feline Med Surg 2012, 14:399-434.

[55] Rodrigues AM, de Hoog GS, Zhang Y, Camargo ZP. Emerging sporotrichosis in driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. Emerg Microbes Infect 2014, 3:e32.

[56] Saeed S, Tariq P. Antibacterialactivity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. Pak J Pharm Sci 2009, 22:421-4.

[57] Santin R. Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae [thesis]. Porto Alegre/RS: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2013.

[58] Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol 2004, 35:275-80.

[59] Schubach TMP, Schubach AO, Okamoto T, Barros MBL, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). Med Micol 2006, 44:87-92.

[60] Schubach TM, Schubach A, Okamoto T, Barros MB, Figueiredo FB, Cuzzi T, et al. Evaluation of na epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). J Am Vet Med Assoc 2004, 224:1623-9.

[61] Sfeir J, Lefrançois C, Baudoux D, Derbré S, Licznar P. In vitro antibacterial activity of essential oils against Streptococcus pyogenes. Evid Based Complement Alternat Med 2013, article ID 269161, 9 pages.

[62] Stangarlin JR, Freitas KRSE, Cruz MÊS. Plantas Medicinais. Biotecnologia Cienc Desenvolv 1999, 2:16-24.

[63] Stopiglia CDO, Vianna DR, Meirelles GC, Teixeira H, von Poser GL, Scroferneker ML. Antifungal Activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against Sporothrix schenckii. J Mycol Méd 2011, 21:169-72.

[64] Suleiman MM, McGaw LJ, Naidoo V, Eloff JN. Evaluation of Several Tree Species for Activity against the Animal Fungal Pathogen Aspergillus fumigatus. S Afr J Bot 2009, 76:64-71.

[65] Sykes JE, Torres SM, Armstrong OJ, Lindeman CJ. Itraconazole for treatment of sporotrichosis in a dog residing on a Christmas tree farm. J Am Vet Med Assoc 2001, 218:1440-3.

[66] Tsai PJ, Tsai TH, Ho SC. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. Food Chem 2007, 105:311-6.

[67] Vági E, Simándi B, Suhajda Á, Héthelyi É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L. extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbon dioxide. Food Res Int 2005, 38:51-7.

[68] Vale-Silva L, Silva MJ, Oliveira D, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L, et al. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *virens* with their in vitro activity against pathogenic yeasts and filamentous fungi. J Med Microbiol 2012, 61:252-60.

[69] Van Vuuren SF, Suliman S, Viljoen AM. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. Lett Appl Microbiol 2009, 48:440–6.

[70] Veiga Jr VF, Pinto AC, Maciel MAM. Plantas Medicinais: Cura Segura? Quim Nova 2005, 28:519-28.

[71] Viganó J, Viganó JÁ, Silva CTAC. Utilização de plantas medicinais pela população da região urbana de três barras do Paraná. Acta Sci Health Sci 2007, 29:51-58.

5 CONCLUSÕES

Segundo a metodologia utilizada, os resultados permitem as seguintes conclusões:

- Os fungos do Complexo *Sporothrix schenckii* foram sensíveis aos óleos essenciais comerciais e extraídos das partes aéreas adquiridas de *O*. *vulgare* L., *O*. *majorana* L. e *R*. *officinalis* L. nas fases leveduriforme e filamentosa, sem diferença significativa entre na origem da extração dos mesmos;
- Todos os extratos aquosos de *O*. *vulgare* L., bem como os extratos hidroalcoólicos de *O*. *vulgare* L. e *O*. *majorana* L. têm atividade anti-*Sporothrix* spp., no entanto, os demais extratos de *O*. *majorana* L. e *R*. *officinalis* L. apresentaram baixa atividade antifúngica, não sendo observada atividade nas infusões a 10 e 60 minutos de *R*. *officinalis* L.
- Todos os produtos fitoterápicos com atividade anti-*Sporothrix* spp. apresentaram atividade fungistática e fungicida sobre isolados clínicos resistentes ao itraconazol;
- Os produtos naturais com melhor atividade anti-*Sporothrix* spp. foram os óleos essenciais das três plantas, os quais apresentaram os seguintes compostos majoritários: carvacrol/γ-terpineno/p-pineno e α-terpineno/4-terpineol/timol (óleo comercial e extraído de *O*. *vulgare* L., respectivamente); α-pineno/1,8-cineol (óleos comercial e extraídos das folhas de *R*. *officinalis* L.); 1,8-cineol/4-terpineol (óleo comercial de *O*. *majorana* L.).
- Os óleos essenciais apresentaram maior citotoxicidade em relação aos extratos, sendo o óleo de *R*. *officinalis* L. o menos citotóxico em relação aos óleos das demais plantas, ao passo que o óleo de *O*. *vulgare* L. foi o mais citotóxico. Entre os extratos, *O*. *majorana* L. e *R*. *officinalis* L. apresentaram menor toxicidade sobre as células mamíferas em comparação aos extratos de orégano.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M.J.; ANSUATEGUI, M.; BERMEJO, P. Active antifungal substances from natural sources. **Arkivoc**, v.7, p.116-145, 2007.

AHMED, S.O.; IBRAHIM, T.Z.; YONAN, M.A. Study the effect of aqueous and alcoholic extracts of some spices on some pathogenic bacteria in different media. **Journal Tikrit University for Agriculture Sciences**, v.12, n.1, p.1-11, 2012.

ALMEIDA, H. L. Jr.; LETTNIN, C. B.; BARBOSA, J. L.; DIAS, M. C. Spontaneous resolution of zoonotic sporotrichosis during pregnancy. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, n. 4, p. 237-238, 2009.

ALVES, G.H.; BANK, D.E.; CLEFF, M.B; HÜBNER, S.O.; FREITAG, R.A. Extrato aquoso de Alecrim: Deteriminação da Concentração Atóxica em Células de Rim de Gato. In: XIII Encontro de Pós-Graduação da Universidade Federal de Pelotas, 2011, Pelotas/RS, Brasil. **Anais...** Pelotas/RS. 2011.

ANDERSON, J.B. Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogens fitness. **Nature Reviews Microbiology**, v.3, p.547-556, 2005.

ANGIONI, A., BARRA, A., CERETI, E., BARILE, D., COISSON, J. D., ARLORIO, M., DESSI, S.; CORONEO, V.; CABRAS, P. Chemical composition, plant genetic difference, antimicrobial and antifungal activity investigation of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, n.11, p.3530–3535, 2004.

ANON. Major Groups, Families, and Genera: Lamiaceae (Labiatae). Royal Botanic Gardens, Kew. Flowering Plant Families: Lamiaceae (Labiatae). University of Hawaii, Department of Botany. 2003. < http://www.botany.hawaii.edu/faculty/carr/lami.htm>

ANTUNES, T.A.; NOBRE, M.O.; FARIA, R.O.; MEINERZ, A.R.M.; MARTINS, A.A.; CLEFF, M.B.; FERNANDES, C.G.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose cutânea experimental: avaliação *in vivo* do itraconazol e terbinafina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.42, n.6, p.706-710, 2009.

APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.49, n.3, p.163–169, 1995.

ASHRAF, Z.; MUHAMMAD, A.; IMRAN, M.; TAREQ, A.H. *In vitro* antibacterial and antifungal activity of methanol, chloroform and aqueous extracts of *Origanum vulgare* and their comparative analysis. **International Journal of Organic Chemistry**, v.1, p.257-261, 2011.

BARRETO, H.M.; SILVA-FILHO, E.C.; LIMA, E.O.; COUTINHO, H.D.M.; MORAIS-BRAGA, M.F.B.; TAVARES, C.C.A.; TINTINO, S.R.; REGO, J.V.; ABREU, A.P.L.; LUSTOSA, M.C.G.; OLIVEIRA, R.W.G.; CITÓ, A.M.G.L.; LOPES, J.A.D. Chemical composition and possible use as adjuvant of the antibiotic therapy of the essential oil of *Rosmarinus officinalis* L. **Industrial Crops and Products**, v.59, p.290-294, 2014.

BARROS, M.B.L.; SCHUBACH, T.M.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**, v.27, n.6, p.455-460, 2010.

BAYDAR, H.; SAGDIC, O.; OZKAN, G. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **Food Control**, v.15, p.169-172, 2004.

BUSATTA, C.; VIDAL, R.S.; POPIOLSKI, A.S.; MOSSI, A.J.; DARIVA, C.; RODRIGUES, M.R.A.; CORAZZA, F.C.; CORAZZA, M.L.; VLADIMIR OLIVEIRA, J.; CANSIAN, R.L. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as na antimicrobial agent in sausage. **Food Microbiology**, v.25, p.207-211, 2008.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 110f. Dissertação (Mestre em Engenharia de Alimentos), Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões – URI, Erechim, RS, Brasil.

CARDOSO, M.; GAVILANES, M. L.; MARQUES, M. C. S.; SHAN, A. Y. K. V.; SANTOS, B. R.; OLIVEIRA, A. C. B.; BERTOLUCCI, V. K. S.; PINTO, A. P. S. **Óleos Essenciais**. Lavras: Editora UFLA, 2000. 42 p.

CARVALHO, M.T.M.; CASTRO, A.P.; BABY, C.; WERNER, B.; NETO, J.F.; QUEIROZ-TELLES, F. Disseminated cutaneous sporotrichosis in a patient with AIDS: report of a case. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 655-659, 2002.

CERNICKA, J.; SUBIK, J. Resistance mechanisms in fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates from vaginal candidiasis. **Internation Journal of Antimicrobial Agents**, v. 27, p.403-408, 2006.

CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazialian Journal Infection Disease**, v.8, p. 217-226, 2004.

CHAUDHARY, N.M.; SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial effects of Oregano (*Origanum vulgare*) against gram negative bacilli. **The Pakistan Journal of Botany**, v.39, p. 609-613, 2007.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.; XAVIER, M.O.; SANTIN, S.; NASCENTE, P.; RODRIGUES, M.R.; MEIRELES, M.C.A. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n.5, p. 1291-1294, 2010.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; SCHUCH, L.F.D.; RODRIGUES, M.R.A.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente à *Sporothrix schenckii*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 2, p. 513-516, 2008.

COLODEL, M. M.; JARK, P. C.; RAMOS, C. J. R.; MARTINS, V. M. V.; SCHNEIDER, A. F.; PILATI, C. Esporotricose cutânea felina no estado de Santa Catarina: relato de casos. Veterinária em Foco, Canoas, RS, v.7, n.1, jul./dez. 2009.

CONTI-DÍAZ, I.A., CIVILA, E.; GEZUELE, E. Treatment of human cutaneous sporotrichosis with itraconazole. **Mycoses**, v.35, p.153–156, 1992.

CRUZ, L.C.H. Complexo *Sporothrix schenckii*. Revisão de parte de literatura e considerações sobre diagnóstico e a epidemiologia. **Veterinária e Zootecnia**, v.20, p.8-28, 2011.

DA ROSA, A.C.; SCROFERNEKER, M.L.; VETTORATO, R.; GERVINI, R.L.; VETTORATO, G.; WEBER, A. Epidemiology of sporotrichosis: a study of 304 cases in Brazil. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v.52, p.451-459, 2005.

DAMIÁN-BADILLO, L.M.; SALGADO-GARCIGLIA, R.; MARTÍNEZ-MUÑOZ, R.E.; MARTÍNEZ-PACHECO, M.M. Antifungal Properties of Some Mexican Medicinal Plants. **The Open Natural Products Journal**, v.1, p.27-33, 2008.

DE ARAUJO, T.; MARQUES, A.C.; KERDEL, F. Sporotrichosis. **International Journal of Dermatology**, v.40, p.737-742, 2001.

DORMAN, H.J.D.; BACHMAYER, O.; KOSAR, M.; HILTUNEN, R. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.762-770, 2004.

EL-ASHMAWY, I.M.; EL-NAHAS, A.F.; SALAMA, O.M. Protective effect of volative oil, alcoholic and aqueous extracts of *Origanum majorana* on lead acetate toxicity in mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.97, p.238-243, 2005.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.49, n.S1, p.7-10, 2002.

FATIMA, A.; GUPTA, V.K.; LUQMAN, S.; NEGI, A.S.; KUMAR, J.K.; SHANKER, K.; SAIKIA, D.; SRIVASTAVA, S.; DAROKAR, M.P.; KHANUJA, S.P.S. Antifungal Activity of *Glycyrriza glabra* Extracts and its Active Constituent Glabridin. **Phytotherapy Research**, v.23, n.8, p.1190-1193, 2009.

FILIPIN, F.B.; SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.167-194, 2006.

FONTOURA, J.B. **Atividade antigúngica das Flores de Girassol (*Helianthus annuus*) contra cepas de *Sporothrix schenckii***. 2010. 25f. Monografia (Graduação em Farmácia), Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre/RS.

GALUPPI, R.S.; AURELI, C.; BONOLI, F.; OSTANELLO, F.; GUBELLINI, E.; TAMPIERE, M.P. Effectiveness of essential oils against *Malassezia* spp.: comparison of two *in vitro* test. **Mikologia Lekarsa**, v.17, n.2, p.79-84, 2010.

GENARO, G. Gato doméstico – comportamento & clínica veterinária. **MedveP Revista Científica de Medicina Veterinária – Pequenos Animais e Animais de Estimação**, v. 3, n.9, p.16-22, 2005

GIORDANI, C.; SANTIN, R.; CLEFF, M.B. **Plantas medicinais e tóxicas em Pelotas, RS – usos e cuidados**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 2012. 138p.

GIORDANI, R.; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; MIKAIL, C.; ABOU, L.; PORTUGAL, H. Antifungal effect of various essential oils against *Candida albicans*. Potentiation of antifungal action of amphotericin B by essential oil from *Thymus vulgaris*. **Phytotherapy Research**, v.18, n.12, p.990-995, 2004.

GREMIÃO, I.D.F.; PEREIRA, A.S.; RODRIGUES, A.M.; FIGUEIREDO, F.B.; NASCIMENTO Jr., A.; SANTOS, I.B.; SCHUBACH, T.M.P. Tratamento cirúrgico associado à terapia antifúngica convencional na esporotricose felina. **Acta Scientae Veterinariae**, v.34, p.221-223, 2006.

GUTERRES, K.A.; DE MATOS, C.B.; OSÓRIO, L.G.; SCHUCH, I.D.; CLEFF, M.B. The use of (1-3) β-glucan along with itraconazole against canine refractory sporotrichosis. **Mycopathologia**, v.177, n.3-4, p.217-221, 2014.

HEIT, M.C.; RIVIERE, J. Antifungal and Antiviral Drugs. In: ADAMS (Eds). **Veterinary Pharmacology and Therapeutics**. Ames: Ioza State University Press, p. 855-885, 1995.

HELAL, R.G.; STELATO, M.M. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare*. In: XIV Encontro de Iniciação Científica da PUC – Campinas, 2009, Campinas, Brasil. **Anais...** Campinas, 2009.

HONSE, C.O.; RODRIGUES, A.M.; GREMIÃO, I.D.F.; PEREIRA, A.S.; SCHUBACH, T.M. Use of local hyperthermia to treat sporotrichosis in a cat. **Veterinary Records**, v. 166, n. 7, p. 208-209, 2010.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M.G.; DONNICI, C.L.; RESENDE, M.A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.38, p.632-637, 2007.

JOSHI, S.; MISHRA, D.; BISHT, G.; KHETWAL, K.S. Essential Oil Composition and Antimicrobial Activity of *Lobelia pyramidalis* Wall. **EXCLI Journal**, v.10, p.274-279, 2011.

KAUFFMAN, C.A.; BUSTAMANTE, B.; CHAPMAN, S.W.; PAPPAS, P.G. Clinical practice guidelines for the management of sporotrichosis: 2007 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v.45, p.1255-1265, 2007.

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

KOHLER L.M.; MONTEIRO, P.C.F.; HAHN, R.C.; HAMDAN, J.S. *In Vitro* Susceptibilities of Isolates of *Sporothrix schenckii* to Itraconazole and Terbinafine. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.9, p.4319-4320, 2004.

KONTOYIANNIS, D.P.; LEWIS, R.E. Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. **The Lancet** , v.359, p.1135-1143, 2002.

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. (Ed.). **Tratado de micologia médica**. 9ªed. São Paulo: Sarvier. p. 479-497. 2002.

LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v.91, n.3, p.453-462, 2001.

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

LICINA, B.Z.; STEFANOVIC, O.D.; VASIC, S.M.; RADOJEVIC, I.D.; DEKIC, M.S.; COMIC, L.R. Biological activities of the extracts from wild growing *Origanum vulgare* L. **Food Control**, v.33, p.498–504, 2013.

LOPES-BEZERRA, L.M.; SCHUBACH, A.; COSTA, R.O. *Sporothrix schenckii* and sporotrichosis. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, v.78, p.293-308, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas Cultivadas**. Editora Instituto Plantarum, Nova Odessa, SP, 2006. 512p

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G.R.; DAROKAR, M.P.; KALRA, A.; KHANUJA, S.P.S. Potential of Rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Alternative Therapies in Health and Medicine**, v.13, n.5, p.54–59, 2007.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.S.; FERNANDES, C.G.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v.173, n.4, p.265-273, 2011.

MADRID, I.M.; SANTOS Jr. R.; SAMPAIO Jr., D.P.; MUELLER, E.N.; DUTRA, D.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose canina: relato de três casos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, n.1, p.105-108, 2007.

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**, v.57, p.151–154, 2010.

MANOHAR, V.; INGRAM, C.; GRAY, J.; TALPUR, N.A.; BAGGHI, D.; PREUSS, H.G. Antifungal activities of origanum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.228, p.111-117, 2001.

MARIMON, R.; SERENA, C.; GENÉ, J.; CANO, J.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of five species of *Sporothrix schenckii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, p.732-734, 2008.

MARIMON, R.; CANO, J.; GENÉ, J.; SUTTON, D.A.; KAWASAKI, M.; GUARRO, J. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana*, three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45, p.3198–3206, 2007.

MARIMON, R.; GENÉ, J.; CANO, J.; TRILLES, M.; DOS SANTOS, L.; GUARRO, J. Molecular phylogeny of Sporothrix schenckii. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3251–3256, 2006.

MÁRQUEZ, B.P. **Componentes Químicos com Actividad Bactericida, Fungicida e Citotóxica de Plantas de la Família Myrtaceae e Lauraceae**. San Nicolás de Los Garza, 2010. 86p. Nuevo León, Mexico. Tese de Doutorado – Faculdade de Ciências Biológicas - Universidad Autónoma de Nuevo León.

MARTÍNEZ, M.G.; MARTÍNEZ, C.M.; UTRILLA, G.B.; MARTÍNEZ, M.N.F. Análisis de la utilización de anfotericina B liposomal. **Revista Iberoamericina de Micología**, v.31, n.2, p.109-113, 2014.

MARTINS, N.; BARROS, L.; SANTOS-BUELGA, C.; HENRIQUES, M.; SILVA, S.; FERREIRA, I.C.F.R. Decoction, infusion and hydroalcoholic extract of *Origanum vulgare* L.: Different performances regarding bioactivity and phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.158, p.73-80, 2014.

MASOKO, P.; PICARD, J.; ELOFF, J.N. The Antifungal Activity of twenty-four Southern African Combretum species (Combretaceae). **South African Journal of Botany**, v.73, n.2, p.173-183, 2007.

MAYER, U.K.; GLOS, K.; SCHMID, M.; POWER, H.T.; BETTENAY, S.V.; MUELLER, R.S. Adverse effects of ketoconazole in dogs - a retrospective study. **Veterinary Dermatology**, v.19, p.199-208, 2008.

McGINNIS, M.R.N.; NORDOFF, N.; LI, R.K.; PASARELL, L.; WARNOCK, D.W. *Sporothrix schenckii* sensitivity to voriconazole, itraconazole, and amphotericin B. **Medical Mycology**, v.39, p.369–371, 2001.

MEINERZ, A.R.M.; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.D.; CLEFF, M.B.; SANTIN, R.; BRUM, C.S.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Sporothrix schenckii* frente à terbinafina e

itraconazol. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.1, p.60-62, 2007.

MEIRELES, M.C.A.; NASCENTE, P.S. **Micologia Veterinária**. Pelotas: Editora Universitária UFPel, 2009, 543p.

MONTEIRO, H.R.B.; TANENO, J.C.; NEVES, M.F. Esporotricose em felinos domésticos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.10, 2008.

MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PINTO, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils angainst feline isolates of *Microsporum canis*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.22, p. 179-184, 2012.

MUGNAINI, L.; NARDONI, S.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; GIULIOTTI, L.; BENSENUTI, M.N.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. A herbal antifungal formulation of *Thymys serpillum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. **Mycoses**, v.56, p.333-337, 2013.

NARDONI, S.; MUGNAINI, L.; PISTELLI, L.; LEONARDI, M.; SANNA, V.; PERRUCCI, S.; PISSERI, F.; MANCIANTI, F. Clinical and mycological evaluation of an herbal antifungal formulation in canine *Malassezia* dermatitis. **Journal de Mycologie Médicale**, . 24, n.3, p.234-240, 2014.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; CAETANO, D.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A.; FERREIRO, L. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, p.137-140, 2001.

NOBRE, M.O.; NASCENTE, P.S.; MEIRELES ,M.C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, v.32, p.175-184, 2002.

NOSTRO, A.; BLANCO, A.R.; CANNATELLI, M.A.; ENEA, V.; FLAMINI, G.; MORELLI, I.; SUDANO, R.A.; ALOAZO, V. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococci* to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, v.230, p.191–195, 2004.

ODDS, F.C.; BROWN, A.J.P.; GOW, N.A.R. Antifungal agents: mechanims of action. **Trends in Microbiology**, v.11, n.6, p.272-279, 2003.

OLIVEIRA, J.L.T.M.; DINIZ, M.F.M.; LIMA, E.O.; SOUZA, E.L.; TRAJANO, V.N.; SANTOS, B.H.C. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. Essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.52, n.1, p 45-50, 2009.

OTSUKA, M.; CASTRO, R.C.C.; MICHALANY, N.S.; LUCAS, R.; LARSSON, C.E.Jr.; LARSSON, C.E. Sporotrichosis in São Paulo (Brazil): clinical and epidemiological features. **Veterinary Dermatology**, v.15, p.46, 2004.

PACKER, J.J.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.102-107, 2009.

PEPELJNJAK, S., KOSALEC, I., KALODERA, Z., BLAZEVIC, N. Antimicrobial activity of juniper berry essential oil (*Juniperus communis* L., Cupressaceae). **Acta Pharmaceutica**, v.55, p.417–422, 2005.

PEREIRA, A.S.; SCHUBACH, T.M.P.; GREMIÃO, I.D.F.; SILVA, D.T.; FIGUEIREDO, F.B.; ASSIS, N.V.; PASSOS, S.R.L. Aspectos terapêuticos da esporotricose felina. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.37, n.4, p.311-321, 2009.

PEREIRA, A.S.; PASSOS, S.R.L.; SILVA, D.T.; GREMIÃO, I.D.F.; FIGUEIREDO, F.B.; TEIXEIRA, J.L.; MONTEIRO, P.C.; SCHUBACH, T.M.P. Response to azolic antifungal agents for treating feline sporotrichosis. **Veterinary Record**, v.166, p.290-294, 2010.

RAMOS E SILVA, M.; VASCONCELOS, C.; CARNEIRO, S.; CESTARI, T. Sporotrichosis. **Clinics in Dermatology**, v.25, p.181-187, 2007.

RODRIGUES, A.M.; DE HOOG, G.S.; ZHANG, Y.; CAMARGO, Z.P. Emerging sporotrichosis in driven by clonal and recombinant *Sporothrix* species. **Emerging and Microbes Infectiou**s, 3:e32, 2014.

RODRIGUES, A.M.; DE MELO, T.M.; DE HOOG, G.S.; SCHUBACH, T.M.P.; PEREIRA, S.A.; FERNANDES, G.F.; BEZERRA, L.M.L.; FELIPE, M.S.; CAMARGO, Z.P. Phylogenetic analysis reveals a high prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in feline sporotrichosis outbreaks. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 7:e2281, 2013.

ROSATO, A.; VITALI, C.; DE LAURENTIS, N.; ARMENISE, D.; ANTONIETTA, M.M.. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, v.14, p.727–732, 2007.

ROSSER, E.; DUNSTAN, R. Sporotrichosis. In: GREENE, C.E. (Ed.). **Infectious diseases of the dog and cat**. 3rd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier; 2006.

ROSSI, C.N.; ODAGUIRI, J.; LARSSON, C.E. Retrospective assessment of the treatment of sporotrichosis in cats and dogs using itraconazole. **Acta Scientae Veterinariae**, v.42, p.1114, 2013.

RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. **Trakia Journal of Sciences**, v.7, n.1, p.37-43, 2009.

SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. **The Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v.22, n.4, p.421-424, 2009.

SANTIN, R **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 106f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre/RS.

SANTORO, G.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.; FREIRE, J.M.; SOARES, M.J. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v.134, p.1649-1656, 2007.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBANEZ, E.; SENORANS, F.J.; REGLERO, G. Chemical composition and antimicrobial activity of *Rosmarinus*

officinalis L. essential oil obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Food Protection**, v.68, n.4, p.790–795, 2005.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.275-280, 2004.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.; OKAMOTO, T.; BARROS, M.B.L.; FIGUEIREDO, F.F.; CUZZI-MAYA, T.; FILHO-MONTEIRO, P.C.; PEREZ, R.S.; WANKE, B. Evaluation of an epidemic of sporotrichosis in cats: 347 cases (1998-2001). **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.224, p.1623-1629, 2004.

SCOTT, D.W.; MILLER, W.H.; GRIFFIN, C. **Dermatologia de Pequenos Animais**, Rio de Janeiro:interlivros,1996, 1130p.

SELLAMI, I. H.; MAAMOURI, E.; CHAHED, T.; WANNES, W. A.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Effect of growth stage on the content and composition of the essential oil and phenolic fraction of sweet marjoram (*Origanum majorana* L.). **Industrial Crops and Products**, v.30, p.395–402, 2009.

SILVA, D.T.; MENEZES, R.C.; GREMIÃO, I.D.F.; SCHUBACH, T.M.P.; BOECHAT, J.S.; PEREIRA, A.S. Zoonotic sporotrichosis: biosafety procedures. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.40, n.4, p.1067, 2012.

SILVA, M.B.T. **Distribuição sócio-espacial da esporotricose humana de pacientes atendidos no Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas no período de 1997 a 2007, residentes no Estado do Rio de Janeiro**. 2010. 143f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Saúde Pública) – Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**. Porto Alegre/Florianópolis, Editora da UFRGS/Editora da UFSC. 2003.

SINGH, D.; KUMAR, T.R.S.; GUPTA, V.K.; CHATURVEDI, P. Antimicrobial activity of some promising plant oils, molecules and formulation. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.50, p.714-717, 2012.

SOUZA, N.A.B.; LIMA, E.O.; GUEDES, D.N.; PEREIRA, F.O.; SOUZA, E.L.; SOUSA, F.B. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of pottentially pathogenic fungi. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.3, p.499-508, 2010.

STOPIGLIA, C.D.O.; VIANNA, D.R.; MEIRELLES, G.C.; TEIXEIRA, H.; VON POSER, G.L.; SCROFERNEKER, M.L. Antifungal Activity of *Pterocaulon* species (Asteraceae) against *Sporothrix schenckii*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.21, n.3, p.169-172, 2011.

SULEIMAN, M.M.; McGAW, L.J.; NAIDOO, V.; ELOFF, N.J. Evaluation of several tree species for activity against the animal fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. **South African Journal of Botany**, v.76, n.1, p.64-71, 2010.

TISSERAND, R.; BALACS, T. **Essential oil safety: A guide for health care professionals**. Churchill Livingstone. 278p. 1995.

TRILLES, L.; FERNÁNDEZ-TORRES, B.; LAZÉRA, M.S.; WANKE, B.; SCHUBACH, A.O.; PAES, R.A.; INZA, I.; GUARRO, J. *In vitro* antifungal susceptibilities of *Sporothrix schenckii* in two growth phases. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.49, n.9, p.3952-3954, 2005.

TSAI, P.J.; TSAI, T.H.; HO, S.C. *In vitro* inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. **Food Chemistry**, v.105, p.311-316, 2007.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHADJA, Á.; HÉTHELYI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* l. extracts obtained with ethyl acohol and supercritical carbon dioxide. **Food Reseach International**, v.28, p.51-57, 2005.

VALE-SILVA, L.; SILVA, M.J.; OLIVEIRA, D.; GONÇALVES, M.J.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L.; PINTO, E. Correlation of the chemical composition of essential oils from *Origanum vulgare* subsp. *Virens* with their *in vitro* activity against pathogenic

yeasts and filamentous fungi. **Journal of Medical Microbiology**, v.61, p.252-260, 2012.

VANACLOCHA, B.; CAÑIGUERAL, S. **Fitoterapia: Vademecum de Prescripción**. 4th ed. Barcelona. 2003.

VEIGA, Jr. V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Quimica Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.

XAVIER, M.O.; NOBRE, M.O.; SAMPAIO Jr., D.P.; ANTUNES, T.A.; NASCENTE, P.S.; SÓRIA, F.B.A.; MEIRELES, M.C.A. Esporotricose felina com envolvimento humano na cidade de Pelotas, RS, Brasil. **Ciência Rural**, v.34, n.6, p.1961-1963, 2004.