

Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de extratos de plantas e óleo de eucalipto sobre *Trichophyton mentagrophytes*FRIAS, D.F.R.^{1*}; KOZUSNY-ANDREANI, D.I.²

¹Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/UNESP, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal. Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, S/N, CEP: 14884-900, Jaboticabal, SP. * danilafrias@yahoo.com.br ²Faculdade de Ciências Agrárias/UNICASTELO, Laboratório de Microbiologia. Estrada Projetada F-1, S/N - Fazenda Santa Rita, CEP: 15600-000, Fernandópolis, SP. doraines@terra.com.br

RESUMO: O presente estudo teve como objetivo determinar a ação antifúngica de extratos de plantas medicinais e óleo de eucalipto frente ao dermatófito *Trichophyton mentagrophytes*, visando a utilização da fitoterapia no controle. As plantas utilizadas na obtenção dos extratos foram arruda (*Ruta graveolens*), citronela (*Cymbopogon nardus*), cravo de defunto (*Tagetes minuta*), eucalipto (*Eucalyptus* spp), graviola (*Annona muricata*), fruta do conde (*Annona* spp), manga (*Mangifera indica*), romã (*Punica granatum*), flores e folhas de primavera (*Bougainvillea spectabilis*). Verificou-se que uso de 0,5% óleo de eucalipto no combate ao *T. mentagrophytes* foi eficaz, já os extratos de citronela (4%) eucalipto (5%) e romã (8%) atuaram como fungistáticos e os restantes não devem ser usados contra este dermatófito porque não causaram nenhum efeito.

Palavras-chave: *Trichophyton mentagrophytes*, dermatófito, óleo de eucalipto, plantas medicinais

ABSTRACT: *In vitro* evaluation of the antifungal activity of plant extracts and eucalyptus oil on *Trichophyton mentagrophytes*. The aim of this study was to assess the antifungal action of medicinal plant extracts and eucalyptus oil against the dermatophyte *Trichophyton mentagrophytes* in order to employ phytotherapy for its control. The plants used for extract production were common rue (*Ruta graveolens*), citronella (*Cymbopogon nardus*), wild marigold (*Tagetes minuta*), eucalyptus (*Eucalyptus* spp), sweetsop (*Annona muricata*), custard apple (*Annona* spp), mango (*Mangifera indica*), pomegranate (*Punica granatum*), besides flowers and leaves of bougainvillea (*Bougainvillea spectabilis*). The use of 0.5% eucalyptus oil was effective in controlling *Trichophyton mentagrophytes*; however, citronella (4%), eucalyptus (5%) and pomegranate (8%) extracts acted as fungistatic, and the remaining extracts should not be used against this dermatophyte since they did not have any effect.

Key words: *Trichophyton mentagrophytes*, dermatophyte, eucalyptus oil, medicinal plants

INTRODUÇÃO

A dermatofitose é doença de caráter contagioso causada por um grupo homogêneo de fungos patogênicos chamados dermatófitos, os quais apresentam marcada afinidade pela queratina afetando, portanto, pêlos, unhas, cascos, penas e células queratinizadas da pele. A dermatofitose é, comparativamente, uma condição clínica comum tanto em animais de companhia como em animais de criação (Tortora et al., 2002; Hirsh & Zee, 2003; Quin et al., 2005). As dermatofitoses podem ser transmitidas de animal para animal, de animal para seres humanos, ou do solo para os animais e para

os seres humanos (Minami, 2003).

Os dermatófitos são fungos septados que existem no mundo todo, sendo reconhecidas mais de trinta espécies. Muitas pertencem aos *Fungi Imperfecti* e são classificadas três gêneros: *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (Tortora et al., 2002; Minami, 2003; Quin et al., 2005). O meio tradicional para propagação de dermatófitos é o ágar Sabouraud com dextrose (De La Maza et al., 1999; Nobre et al., 2000; Hirsh & Zee, 2003).

Como as dermatofitoses são zoonoses, o tratamento e o controle são particularmente importantes

em carnívoros domésticos. O tratamento das infecções por dermatófitos deve ser direcionado para a erradicação do material infeccioso dos animais infectados, dos portadores e do ambiente. Para tal finalidade, ficam indicados cortes dos pêlos, isolamento apropriado, medidas sanitárias, terapia tópica e administração sistêmica de medicamentos fungicidas ou fungistáticos (Quin et al., 2005). Estudos têm demonstrado que para o controle de algumas espécies de dermatófitos é necessária a utilização de concentrações relativamente altas de determinados fungicidas causando efeitos maléficos ao paciente (Hirsh & Zee, 2003; Quin et al., 2005).

Na atualidade, muitas instituições têm se empenhado na utilização de tratamentos alternativos para o controle de diferentes agentes etiológicos de doenças. O tratamento à base de plantas medicinais, ou fitoterapia, está ganhando força inédita no Brasil. Devido a este motivo, o presente trabalho tem como objetivo determinar a ação antifúngica de extratos de plantas medicinais e óleo de eucalipto frente ao fungo patogênico *Trichophyton mentagrophytes*, visando à utilização da fitoterapia para o controle do mesmo.

MATERIAL E MÉTODO

Local de trabalho

O experimento foi conduzido no Laboratório de Microbiologia, da Faculdade de Ciências Agrárias da Universidade Camilo Castelo Branco, Campus Fernandópolis, SP.

Fungo utilizado no estudo

Para avaliação da atividade antifúngica foi escolhido o dermatófito *Trichophyton mentagrophytes* isolado de pêlo de cão. Este fungo é responsável por grande número de casos de dermatomicoses em animais e seres humanos.

Preparo dos extratos brutos de plantas medicinais

Para preparação do extrato bruto foram utilizadas folhas de arruda (*Ruta graveolens* L.), citronela (*Cymbopogon nardus* DC.) Stapf, tiririca (*Cyperus rotundus* L.), cravo de defunto (*Tagetes minuta* L.), eucalipto (*Eucalyptus tereticornis* Labill), graviola (*Annona muricata* L.), conde (*Annona squamosa* L.), manga (*Mangifera indica* Linn), romã (*Punica granatum* L.), folhas e flores de calêndula (*Calendula officinalis* L.), flores e folhas de primavera (*Bougainvillea spectabilis* Willd) obtidas da coleção de plantas da Faculdade de Ciências Agrárias, UNICASTELO, Campus de Fernandópolis, coletadas em junho de 2005.

Os extratos brutos foram preparados utilizando-se 300 g de folhas, previamente lavadas, e

450 mL de água deionizada. O material vegetal foi misturado e triturado em liquidificador, esta mistura foi posteriormente coada e filtrada, e em seguida, os extratos foram esterilizados em autoclave por 15 minutos, a uma atmosfera de pressão. Os extratos brutos foram conservados a $10 \pm 2^\circ\text{C}$.

Óleo de eucalipto

O óleo essencial de eucalipto (Nogueira®) foi obtido no comércio.

Avaliação da atividade antifúngica

Para a determinação da atividade antifúngica de extratos de plantas e de óleo de eucalipto foi utilizado meio Sabouraud dextrose (Difco Laboratories Ltda – Detroit/USA). O mesmo foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 120°C e uma atmosfera de pressão. O meio foi retirado da autoclave e resfriado até atingir 50°C , momento no qual foram adicionados e misturados perfeitamente os extratos brutos de plantas e óleo de eucalipto. Para cada concentração e cada tipo de extrato foram preparados 100mL de meio de cultura Sabouraud. As concentrações avaliadas foram de 0,5 a 10% (v/v). Foram empregadas placas de Petri (10 x 90 mm) nas quais foram depositados 15 mL de meio de cultivo, o mesmo permaneceu na câmara de fluxo laminar até total solidificação.

Uma vez solidificado, o meio foi inoculado com discos de micélio (1,5 mm) retirados de uma cultura de *T. mentagrophytes*. Placas de Petri contendo meio Sabouraud sem adição do extrato foram utilizadas como testemunhas (controle do desenvolvimento do fungo). Para todos os tratamentos foram empregadas quatro repetições. As placas foram incubadas em B.O.D. a temperatura de $36 \pm 0,5^\circ\text{C}$, sem luminosidade, até a verificação do desenvolvimento das colônias na placa controle sem adição do extrato. O desenvolvimento do fungo foi analisado diariamente.

A avaliação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada pela medição do diâmetro das colônias. Os dados obtidos foram tabulados para análise de resultados pelo teste F na análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o "software" SAS- *Statistical Analyses System*.

RESULTADO

Na Tabela 1 estão representados os resultados obtidos quanto a atividade antifúngica de diferentes extratos de plantas e óleo essencial de eucalipto. Verificou-se que os extratos de folhas arruda, cravo de defunto, graviola, flores e folhas de primavera, tiririca e manga não causaram nenhum

TABELA 1. Valores médios dos diâmetros das colônias (cm) de *Trichophyton mentagrophytes* cultivados em meio agar Sabouraud dextrose suplementado com diferentes extratos de plantas e óleo essencial de eucalipto.

Espécies Vegetais	Concentração dos Extratos Brutos e Óleo Essencial (%)										
	0,5	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	7,0	8,0	9,0	10,0
Arruda	6,8a*	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a
Citronela	7,0a	6,1a	5,3a	4,9a	3,3b	3,3b	3,3b	3,2b	3,3b	3,2b	3,3b
Tiririca	7,5a	8,0a	8,8a	8,8a	8,9a	8,8a	8,8a	8,7a	8,8a	8,8a	8,9a
Cravo defunto	7,0a	6,9a	6,9a	6,8a	6,7a	6,4a	6,4a	6,5a	6,5a	6,4a	6,4a
Eucalipto	6,0a	5,9a	5,3a	5,0a	4,5a	3,0b	3,0b	3,1b	3,1b	3,0b	3,0b
Graviola	6,7a	6,8a	6,7a	6,5a	6,5a	6,4a	6,4a	6,4a	6,3a	6,4a	6,4a
Conde	6,7a	6,7a	6,7a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a	6,5a
Manga	7,1a	7,0a	7,1a	7,0a	6,9a	6,9a	6,7a	6,8a	6,7a	6,7a	6,7a
Romã	6,5a	6,5a	6,4a	6,4a	5,8a	5,5a	4,5a	4,1a	3,5b	3,1b	3,2b
Calêndula	7,1a	7,0a	7,1a	7,0a	6,9a	6,9a	6,7a	6,8a	6,7a	6,7a	6,7a
Primavera	6,7a	6,8a	6,7a	6,7a	6,5a	6,4a	6,5a	6,5a	6,4a	6,3a	6,4a
Óleo essencial de Eucalipto	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c	0,0c
Testemunha	6,7a	6,9a	6,7a	6,8a	6,9a	6,7a	6,7a	6,7a	6,7a	6,76a	6,7a
CV%	6,6	6,7	7,1	7,5	7,0	7,2	6,6	7,5	7,9	7,4	7,2

*Diâmetro das colônias expresso em cm. As médias de cada coluna seguidas pela mesma letra não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey (5% de probabilidade).

tipo de efeito antifúngico nas concentrações utilizadas. Já os extratos de citronela, eucalipto e romã apresentaram atividade fungistática contra *T. mentagrophytes*, em concentrações de 4, 5 e 8%, respectivamente. O valor médio do diâmetro da colônia de *Trichophyton mentagrophytes* na placa testemunha foi de 6,7 cm.

Efeito inibitório do desenvolvimento deste dermatófito foi observado na utilização de óleo de eucalipto em todas as concentrações utilizadas. Foram realizadas provas para avaliar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de eucalipto, e verificou-se efeito que o antifúngico na concentração de 0,13% (Figura 1).

DISCUSSÃO

Algumas espécies de plantas da floresta tropical possuem propriedades terapêuticas, razão pela qual, estudos têm sido realizados para verificar atividade antifúngica destes vegetais, motivo principal

que levou ao desenvolvimento deste trabalho. Os extratos de plantas de *Coyza aegyptiaca* apresentam propriedades fungicidas e fungistáticas sobre *Microsporium canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes* e *Cândida*, o que comprova a viabilidade do uso. Determinações fitoquímicas mostraram que estas plantas são ricas em taninos e flavonóides, responsáveis pela atividade antifúngica (Batawila et al., 2002). Makinde et al. (2007) e Viana et al. (2008) verificaram a eficiência de extratos etanólicos de *Cassia alata* e *Senna alata* no controle de diversas espécies de fungos como *M. canis*, *T. mentagrophytes*, *Aspergillus flavus*, *Candidas albicans* e *Monosporascus cannonballus*. No presente trabalho verificou-se que os extratos das onze espécies vegetais avaliadas somente os extratos de citronela, romã e eucalipto foram eficientes no controle de *T. mentagrophytes*.

A falta de atividade antifúngica dos extratos de arruda, cravo de defunto, graviola, conde, calêndula, tiririca, manga e primavera poderia estar relacionada

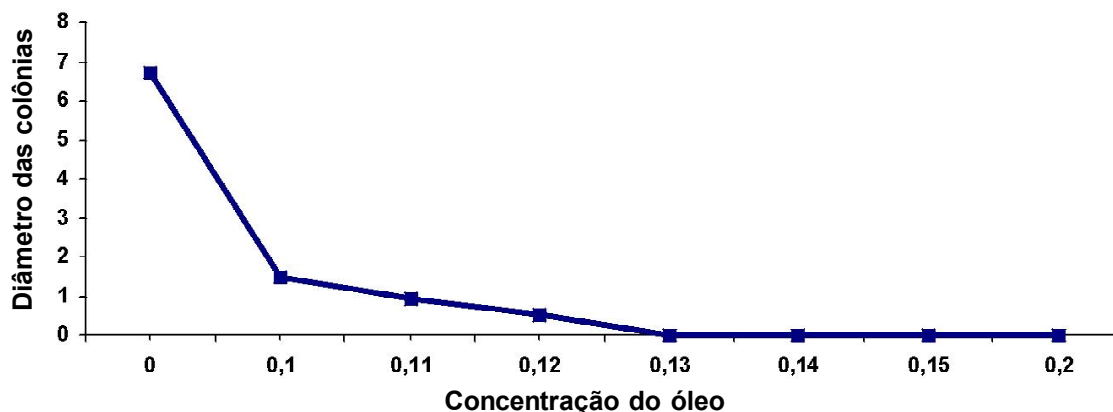


FIGURA 1. Concentração inibitória mínima (cm) do óleo essencial de eucalipto frente ao dermatófito *Trichophyton mentagrophytes*.

com as doses utilizadas. Viana et al. (2008) enfatizam que atividade antifúngica de extratos de plantas pode estar influenciada pelo ambiente ao qual a planta foi submetida, a fatores genéticos, a utilização de diferentes métodos de extração, ao pH, a temperatura e ao uso de diferentes concentrações. Vários trabalhos mostram que o uso de diferentes concentrações pode interferir nos resultados obtidos em experimentos onde foram utilizadas as mesmas espécies vegetais (Ranganathan & Balajee, 2000; Somchit et al., 2003).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais também está sendo bastante utilizada para o controle de dermatófitos e fungos sapróbios (Dáuria et al., 2001; Pereira et al., 2006). Óleos essenciais extraídos de limão e citronela, e de alguns componentes óleos essenciais, tais como citral, geraniol, citronelol e citronelal foram testados em *Cândida albicans*, *M. gypseum*, *Sporothrix schenckii* e *Aspergillus niger*. O óleo de limão apresentou alta atividade antifúngica para todos os organismos testados, o óleo de citronela foi eficiente para *M. gypseum* (Dharmendra et al., 2001). Alguns metabólitos isolados ou frações de extratos de plantas também têm demonstrado atividade antifúngica, como por exemplo, o óleo essencial de *Lantana aculeata* com atividade contra *A. flavus*, *A. niger*, *A. fumigatus*, *M. gypseum*, *Penicillium* e *Rhizopus stolonifer* (Saxena & Sharma, 1999). As diferentes concentrações utilizadas, tem demonstrado que o óleo de eucalipto apresenta atividade antifúngica, exercendo controle do crescimento *T. mentagrophytes*. Estes resultados discordam dos obtidos por Belém et al. (2003), que verificaram resistência de *Malessezia furfur* aos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*. No entanto, Sá et al. (1996) obtiveram resultados de suscetibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* quando tratadas com óleo de eucalipto.

A composição dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, fatores ambientais podem causar variações significativas em seus componentes. A época e local de colheita, horário, o modo de secagem e preparo, a umidade e o solo onde são cultivadas as plantas, podem influenciar no teor do óleo extraído (Santos et al., 2004; Gobbo-Neto & Lopes, 2007). Provavelmente, muitos destes fatores influenciaram na composição do óleo eucalipto empregado neste trabalho e no óleo utilizado por Belém et al. (2003). Deve-se destacar que estes autores avaliaram óleo de *E. globulus*, enquanto que para o controle de *T. mentagrophytes* foi utilizado óleo extraído de *E. tereticonis*, ainda deve ser considerada região geográfica onde foram cultivadas ambas as espécies.

As pesquisas sobre as ações antibacterianas e antifúngicas de extratos obtidos de plantas medicinais ou não, tem sido amplamente comprovadas em estudos com óleos fixos e essenciais, terpenos, fitoalexinas, cumarinas, entre muitos outros componentes (Belem, 2002; Mariath et al., 2006). Provavelmente esta atividade antimicrobiana está relacionada com o papel de defesa contra os fungos e bactérias fitopatogênicas que estes compostos exercem nas plantas (Jansen et al., 1987).

Na maioria dos lugares do mundo o controle de doenças é realizado através de fármacos antimicrobianos. Sem dúvida a utilização racional desses produtos pode ter, em curto prazo, efeitos positivos, no entanto em longo prazo, podem ser negativos como resultado do surgimento de isolados resistentes às substâncias utilizadas. Todavia, somente os fármacos não serão capazes de resolver a crescente problemática das infecções fúngicas. Melhorias no diagnóstico de tais infecções, que propiciem maior rapidez no início da terapia e a escolha apropriada do antifúngico; além de profilaxia eficaz e desenvolvimento de medicamentos que aumentem a capacidade de resposta dos organismos também são necessários (Bergold & Georgiadis, 2004). Em função aos danos que alguns antifúngicos podem causar ao paciente, a tendência atual é a utilização de fitoterápicos no controle e tratamento de microrganismos patogênicos. Nas últimas décadas observa-se um grande interesse pelo potencial terapêutico de plantas medicinais (Yunes et al., 2001), sabe-se que cerca de 30% das drogas prescritas no mundo são obtidas direta ou indiretamente de plantas (Kohen & Carter, 2005). Esta prática ainda não é uma prática adotada rotineiramente na medicina veterinária por falta de inclusão destes medicamentos na clínica diária. A atividade antifúngica do óleo de eucalipto no combate ao *T. mentagrophytes*, mostram a possibilidade de ser utilizado, após testes *in vivo*, como método alternativo de tratamento da dermatofitose em cães causada por este fungo.

CONCLUSÃO

Conclui-se que, o uso de óleo de eucalipto na concentração 0,13% apresentou atividade antifúngica *in vitro* contra o dermatófito *T. mentagrophytes*. Já o de extrato de romã, citronela e eucalipto atuam como fungistáticos na concentração 8%, 4% e 5%, respectivamente, e o restante dos extratos utilizados neste experimento não causou nenhum tipo de efeito.

REFERÊNCIA

- BATAWILA, K. et al. Activite antifongique d'une espece en voie de disprition de la flore togolaise: *Conysa aegyptiaca* (L) Ait. Var. Linearloba (DC.) O. Hoffm. (Asteraceae). **Acta Botanica Gallica**, v.149, p.41-8, 2002.
- BELEM L.F. **Estudo epidmiológico da pitiríase versicolor no estado da Paraíba e avaliação química e antifúngica de produtos naturais e sintéticos contra seu agente etiológico**. 2002. 178p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.
- BELEM, L.F. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais *in vitro* contra cepas de *Malessezia furfur*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.6, n.1, p.77-83, 2003.
- BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v.5, n.2, p.159-72, 2004.
- DÁURIA, F.D. et al. *In vitro* activity of tea tree oil against *Candida albicans* mycelial conversion and other pathogenic fungi. **Journal of Chemotherapy**, v.13, n.4, p.377-83, 2001.
- DE LA MAZA, L.M.; PEZZLO, M.T.; BARON, E.J. **Atlas de diagnóstico em microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 1999. 216p.
- DHARMENDRA, S. et al. Comparative antifungal activity of essential oils and constituents from three distinct genotypes of *Cymbopogon* spp. **Current-Science**, v.80, p.1264-6, 2001.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. Fatores que interferem no teor de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-81, 2007.
- HIRSH, D.C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 446p.
- JANSEN, A.M. et al. Antimicrobials activity of essential oils. **Pharmaceutisch Weekblad**, v.9, p.193-7, 1987.
- KOEHN, F.E.; CARTER, G.T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.4, n.3, p.206-20, 2005.
- MAKINDE, A.A. et al. Antimicrobial activity of *Cassia alata*. **African Journal of Biotechnology**, v.6, n.13, p.1509-10, 2007.
- MARIATH, I.R. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Eugenia aromática* B. contra fungos dematiáceos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.87, n.3, p.81-4, 2006.
- MINAMI, P.S. **Micologia: métodos laboratoriais de diagnósticos das micoses**. São Paulo: Manole, 2003. 199p.
- NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; CORDEIRO, J.M.C. Importância do felino doméstico na epidemiologia da dermatofitose por *Microsporum canis*. **Revista da Faculdade de Zootecnia, Veterinária e Agronomia de Uruguaiana**, v.7/8, n.1, p.81-4, 2000.
- PEREIRA, M.C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência Agrotécnica**, v.30, n.4, p.731-8, 2006.
- QUIN, P.J. et al. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.
- RANGANATHAN, S.; BALAJEE, S.A.M. Anti-*Cryptococcus* activity of combination *Cassia alata* e *Ocimum sanctum*. **Mycoses**, v.43, n.7/8, p.299-301, 2000.
- Sá, R.C. et al. Activité antimicrobienne d'nuilles essentielles sur les bacteries qui causent lá conjuntivite. **Boletim da Sociedade Broteriana**, v.67, p.99-103, 1996.
- SANTOS, S.C. et al. Antifungal activity of *Eugenia uniflora* L fractions against *Paracoccidiodes brasilienses* (Splendore) Almeida. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.1, p.30-3, 2004.
- SAXENA, V.K.; SHARMA, R.N. Antimicrobial activity of the essential oil of Lantana aculeata. **Fitoterapia**, v.70, n.1, p.67-70, 1999.
- SOMCHIT, M.N. et al. In vitro antimicrobial activity of ethanol and water extracts of *Cassia alata*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84, p.1-4, 2003.
- TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. **Microbiologia**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 827p.
- VIANA, M.G. et al. Avaliação do potencial fungicida de extratos etanólicos de *Senna alata* contra *Monoscaraspus cannonballus*. **Ciência Agrotécnica**, v.32, n.5, p.1387-93, 2008.
- YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-52, 2001.