

SENSIBILIDADE DE ISOLADOS CLÍNICOS DE *Malassezia pachydermatis* AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Origanum vulgare*

SILVA, Maryane Dias Araujo¹; SANTIN, Rosema²; MEIRELES, Mário Carlos Araujo³; MELLO, João Roberto Braga⁴; CLEFF, Marlete Brum⁵

¹Universidade Federal de Pelotas, Graduanda em Medicina Veterinária, bolsista PROBIC/FAPERGS;

²Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Doutoranda- PPG em Ciências Veterinárias;

³Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Veterinária Preventiva; ⁴Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciências Básicas da Saúde; ⁵Universidade Federal de Pelotas, Departamento de Clínicas Veterinárias. maary_diaraujo@hotmail.com

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais na terapêutica de enfermidades acompanha a evolução da humanidade. Desde os primórdios da civilização, tem sido descrito o uso popular das plantas no tratamento de doenças mesmo sem confirmação científica. Ainda hoje, nos países de terceiro mundo, cerca de 70-80% da população não tem acesso à assistência farmacêutica, e as plantas medicinais representam uma fonte viável para o tratamento de enfermidades (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Origanum vulgare L., popularmente chamado de orégano é um condimento bastante conhecido, principalmente pelo uso na culinária, porém também vem sendo reconhecido pelo valor medicinal. Além das folhas usadas no tratamento popular, o óleo essencial tem demonstrando eficácia em pesquisas, principalmente com ação antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001; MANOHAR et. al. 2001; SOUZA et al. 2005; CLEFF et al., 2010).

Malassezia pachydermatis é uma levedura comensal da pele, meato acústico externo e mucosas de diferentes espécies animais. Quando há alguma alteração no microambiente, como aumento da temperatura, umidade e substrato, bem como desequilíbrio na imunidade do hospedeiro ocorre o aumento no número de células e a passagem da levedura da forma comensal para a parasitária (NOBRE et al., 1998; NASCENTE et al., 2004).

Tendo em vista a importância desta levedura como um dos principais agentes de otites externas e dermatites secundárias em cães e a grande importância do uso de plantas medicinais na Veterinária, objetivou-se com este trabalho avaliar a atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de orégano frente a *Malassezia pachydermatis*.

2 METODOLOGIA (MATERIAL E MÉTODOS)

Para realização do estudo da atividade antifúngica, o *Origanum vulgare* de origem peruana foi adquirido de distribuidor comercial com certificado de qualidade. Para obtenção do óleo essencial, o produto foi submetido à hidrodestilação em aparelho Clevenger por 4h no Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPEL. Foram estudados 17 isolados de *Malassezia pachydermatis* provenientes de casos clínicos de otites (n=15) e dermatites (n=2) em cães. Para tal, foi utilizada a técnica de Microdiluição em Caldo de acordo com o documento M27A3

do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com modificações para óleos essenciais e *M. pachydermatis*.

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens (48h) em ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol. Uma alçada da colônia foi suspensa em solução salina estéril, homogeneizada e ajustada em espectrofotômetro com comprimento de onda 530nm e com transmitância de 60-65%. A partir desta solução foi realizada uma diluição de 1:50 em solução salina estéril e, em seguida, outra diluição de 1:20 em meio Sabouraud líquido. O óleo essencial de orégano foi testado nas concentrações de 30mg/mL a 0,9mg/mL em meio de cultura e tween 80 para facilitar a homogeneização. Todos os isolados foram testados em duplicata.

Depois de preenchidas, as microplacas foram incubadas a 35°C por 72h para realização da leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Posteriormente, foi realizada a transferência de 10µL de cada pocinho para placas de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol, as quais foram e incubadas a 35°C por 72h para leitura da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores de CIM variaram de <0,9 a 0,38% e da CFM variaram de <0,9 a 0,75%. Dentre os 17 isolados, quatro apresentaram valores de CFM maiores do que os encontrados para CIM, ou seja, nesses casos a concentração fungicida foi maior que a concentração que inibiu o crescimento (Tab. 1).

Tabela 1 - Valores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de orégano sobre isolados de *M.pachydermatis* provenientes de otites ou dermatites em cães

Isolados <i>M.pachydermatis</i>	Óleo essencial de orégano	
	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)
1	<0,9	1,9
2	<0,9	<0,9
3	<0,9	<0,9
4	1,9	1,9
5	<0,9	<0,9
6	<0,9	<0,9
7*	<0,9	<0,9
8*	3,8	3,8
9	<0,9	<0,9
10	<0,9	<0,9
11	<0,9	<0,9
12	3,8	3,8
13	3,8	7,5
14	3,8	3,8
15	1,9	3,8
16	<0,9	1,9
17	1,9	1,9

*Isolados provenientes de casos clínicos de dermatite em cães

Observou-se que nos isolados provenientes de otite canina (n=15) e dermatite (n=2) houve variação de CIM e CFM, sendo que 53,3% (n=8) dos isolados

de otite e 50% (n=1) de dermatite necessitaram de concentrações maiores que 0,9mg/mL para inibir o crescimento da levedura. O que provavelmente ocorreu devido a quadros clínicos persistentes ou crônicos, pois a prevalência de *M. pachydermatis* em otite externa crônica já foi descrita anteriormente (GENTILLINI et al., 1991; NOBRE et al., 2001).

Os valores de CIM e CFM encontrados neste estudo estão de acordo com Cleff et al. (2010), que descrevem *M. pachydermatis* como uma das espécies que apresenta maior sensibilidade ao óleo essencial de orégano (0,03 e 0,015%), assim como, para Prestes et al. (2008), Rusenova e Parvanov (2009) que obtiveram CIM do óleo entre 0,06 e 0,25% frente a esta levedura.

Os estudos relacionando a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais têm aumentado nos últimos anos, principalmente com relação aos óleos essenciais como o de *Origanum vulgare* (LAMBERT et al., 2001; CLEFF et al., 2010). Em um estudo *in vitro*, realizado por Cleff et al. (2008), foi comprovada a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano frente ao *Sporothrix schenckii*. O óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes químicos também demonstraram potencial antifúngico frente a diferentes espécies de leveduras como *Candida*, *Cryptococcus*, *Aspergillus* e dermatófitos (MANOHAR et al., 2001; CLEFF et al., 2010; SOUZA, 2010). No entanto, ainda são escassos estudos de sensibilidade aos extratos vegetais com relação a essa levedura de grande importância na clínica médica de pequenos animais.

Neste contexto, o óleo essencial de orégano representa uma promissora alternativa terapêutica nos casos de otite e dermatite por *Malassezia pachydermatis*, porém para sua utilização, ainda são necessários estudos, incluindo estudos *in vivo*.

4 CONCLUSÃO

Os resultados permitem concluir que o óleo essencial de orégano possui potencial antifúngico *in vitro* frente a isolados de *Malassezia pachydermatis*.

5 AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, CAPES e FAPERGS.

6 REFERÊNCIAS

CLEFF, M.B.; MEINERZ, 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**, Minas Gerais, v.60, n.2, p.513-516, 2008.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; FARIA, R.O.; XAVIER, M.O.; SANTIN, R.; NASCENTE, P.S.; 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**, Minas Gerais, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.

CLSI – **Clinical and Laboratory Standards Institute**. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard. M27-A3, 2008.

GENTILINI, E.; DENAMIEL, G.A.A.; ESCALADA, J.; NEYRA, J. Otitis canina crônica hallazgos microbiológicos y sensibilidad a los antibióticos. **Veterinaria Argentina**, Buenos Aires-Argentina, v.8, p.113-117, 1991.

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

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

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; GOMES, F.R.; SOUZA, L.L.; MEIRELES, M.C.A. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Rio de Janeiro, v.26, n.2, p.79-82, 2004.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M.C.A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and other infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul state, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.32, n.3, p.245-249, 2001.

NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; GASPARG, L.F.; PEREIRA, D.I.B.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L.F.D.; SOUZA, L.L.; SOUZA, L.S. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência Rural**, Santa Maria/RS, v.28, n.3, p.447-452, 1998.

PRESTES, L.S.; FRASCOLLA, R.; SANTIN, R.; SANTOS, M.A.Z.; SCHRAMM, R.C.; RODRIGUES, M.R.A.; SCHUCH, L.F.D.; MEIRELES, M.C.A. Actividad de extractos de orégano y tomillo frente a microorganismos asociados con otitis externa. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, Cuba, v. 13, p.54480, 2008.

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

SOUZA, E.L.; STAMFORD, T.L.M.; LIMA, E.O.; TRAJANO, V.N.; BARBOSA FILHO, J.M. Orégano (*Origanum vulgare* L., Lamiaceae): uma especiaria como potencial fonte de compostos antimicrobianos. **Revista Higiene Alimentar**, Mirandópolis/SP, v.19, n.132, p.40-45, 2005.

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

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