

EFEITO DO EXTRATO ETANÓLICO DE *Rosmarinus officinalis* EM ISOLADOS CLÍNICOS DE *Malassezia pachydermatis*

CAMILA SANTOS MATOS¹; GABRIELA HÖRNKE ALVES²; DAIANE EINHARDT BLANK³; CLAUDIA GIORDANI⁴; ROGÉRIO ANTÔNIO FREITAG⁵; MARLETE BRUM CLEFF⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – camilasm7@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – gabiha.alves@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – daiane_blank@yahoo.com.br

⁴Universidade Federal de Pelotas – claarte@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – rafreitag@gmail.com.br

⁶Universidade Federal de Pelotas – marletecleff@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As micoses destacam-se dentre as dermatopatias diagnosticadas na clínica de animais de companhia (MACHADO et al., 2004). *Malassezia pachydermatis* é constantemente isolada como microbiota de conduto auditivo e pelame dos animais de companhia, sendo no cão associado a quadros clínicos de otites externas e dermatites com proliferação associada a processos de desequilíbrio local ou sistêmico representando um alvo terapêutico a ser estudado (LEITE et al. 2003).

Os antifúngicos ainda são de uso restrito, e existem poucos fármacos disponíveis, quando comparados com a quantidade de drogas antibacterianas existentes. Os extratos vegetais e outros derivados de plantas, vem sendo amplamente estudados e aplicados em formulações fitoterápicas, com a finalidade da descoberta de novos componentes bioativos e também com interesse na redução de efeitos colaterais (ANSARULLAH et al., 2009).

Rosmarinus officinalis é conhecido popularmente como alecrim, e apresenta importância devido sua capacidade aromática, bem como as propriedades medicinais dos extratos (CLEFF et al., 2012), porém pouco avaliado em relação a isolados clínicos de pequenos animais, como no caso de *M. pachydermatis* (SANTIN et al, 2014).

Assim, o objetivo do trabalho foi determinar a atividade antifúngica do extrato etanólico de *R. officinalis* em *M. pachydermatis* isolada de casos clínicos de cães com malasseziose.

2. METODOLOGIA

A amostra de folhas secas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foi adquirida no comércio local (Pelotas-RS) e encaminhada ao Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos da UFPel para a obtenção do extrato.

Para preparação do extrato utilizou-se folhas secas e água destilada e/ou álcool etílico numa concentração de 10%. A amostra vegetal foi colocada em balão de fundo redondo e mantida sob agitação constante, em chapa de aquecimento com banho de óleo, até temperatura de 65°-70°C e mantido por 24h.

Os extratos foram analisados empregando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) utilizando o equipamento da Varian com detector de arranjo de diodos (DAD) com varredura de 200 a 800 nm. As soluções de extratos etanólicos foram solubilizadas em metanol e foram preparadas em balão

volumétrico individualmente para análise, sendo utilizados padrões com alto grau de pureza adquiridos de Sigma Aldrich.

Os isolados de *Malassezia pachydermatis* foram obtidos de cães com malasseziose cutânea e auricular, totalizando 35 amostras clínicas, identificados e armazenados na micoteca do Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MICVET), FaVet - UFPEL. A avaliação da atividade antifúngica dos extratos foi realizada pelo método de microdiluição em caldo (CLSI M27-A3), com adaptações para fitofármacos. No teste foi utilizada solução-estoque do extrato de alecrim (400mg/mL) em diluição seriada (200 a 6,25mg/mL) em meio líquido de ágar Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol (ASDC), realizado em duplicata.

Nas microplacas foi estabelecido colunas de controle teste positivo (meio de cultura e inóculo), negativo (meio de cultura) e controle do dimetilsulfóxido, sendo as microplacas incubadas a 37°C por 72 horas. A leitura do teste foi realizada por comparação visual do crescimento da levedura, expressando a concentração inibitória mínima (CIM). Já a concentração fungicida mínima (CFM) foi obtida através da observação do crescimento após semeadura de 10µL dos poços em ASDC e incubadas a 37°C por 48 horas. Também foi realizado teste de suscetibilidade do fungo frente ao antifúngico padrão cetoconazol.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise química dos extratos etanólicos de *R. officinalis* demonstraram presença de flavonóide caempferol, de ácido caféico, ácido rosmarínico, os diterpenos fenólicos carnosol e ácido carnósico e os flavonóides, luteolina e apigenina, além de quercetina. Enquanto que BAI (2010) em estudo com extratos de *R. officinalis*, analisados por CLAE-DAD (cromatografia líquida de alta eficiência), identificou os diterpenos fenólicos carnosol e ácido carnósico, o ácido rosmarínico e os flavonóides caempferol e luteolina, semelhantes ao observado em nosso estudo.

Na análise *in vitro* da sensibilidade dos isolados (CIM e CFM), constatou-se que o extrato etanólico de alecrim obteve médias com CIM de 44,08 mg/mL e CFM de 70,39 mg/mL. SANTIN (2013) demonstrou a eficácia *in vitro* do óleo essencial do alecrim contra *M. pachydermatis* com CIM e CFM entre $\leq 1,87$ a 30 mg/mL, assim como WALLER (2015) para o *Sporothrix spp.*, outro fungo de importância veterinária, com CIM e CFM $\leq 2,25$ mg/mL. Essa diferença entre os resultados de CIM e CFM no presente trabalho pode ser explicada devido o tipo de extrato utilizado, já que conforme a parte vegetal, tipo de extração e fatores intrínsecos e extrínsecos das plantas, os compostos químicos podem variar na sua disponibilidade e consequentemente na sua atividade antimicrobiana (FARIAS 2003), assim como espécie fúngica é totalmente determinante em relação a sensibilidade. Em outro estudo realizado pelo grupo de pesquisa, o óleo essencial de *R. officinalis* também demonstrou atividade sobre a levedura *Candida albicans* observando-se CIM de 2,5 a 10 µg/mL e CFM de 5 a 10 µg/mL (CLEFF et al., 2012). Sabe-se que os óleos essenciais de *R. officinalis* são constituídos preferencialmente por terpenos como borneol, pineno, cineol, canfeno, eucaliptol, e cânfora, entre outros (CHALCHAT et al., 1993), diferentemente dos extratos que apresentam em sua composição ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos e flavonóides, os quais foram demonstrados nos resultados do nosso estudo, e que certamente tiveram atuação nos isolados da levedura. Deve-se ainda considerar a possibilidade de existência de um sinergismo entre os compostos presentes no extrato frente a *M. pachydermatis*

para obtenção da atividade de inibição. Sabe-se que a parede celular das leveduras do gênero *Malassezia* é muito fina, estando envolta por uma camada capsular ou lamelar a qual contém lipídeos, no entanto ainda não existem descritos mecanismos de ação dos extratos nesta levedura (ASHBEE, 2007).

Estudo realizado por CARDOSO et al., (2010), indicaram sensibilidade de isolados clínicos de bactérias Gram positivas, como o *Staphylococcus* e de *M. Pachydermatis*, frente a extratos etanólico de própolis, resultando em inibição dos microrganismos causadores de otite em cães. Pesquisas e resultados como estes são importantes, pois cada vez mais são sugeridas medidas tecnológicas para se resolver a questão da resistência, sendo uma destas medidas o estudo de novos antimicrobianos oriundos de espécies vegetais (CECHINEL FILHO, 2000; SOUZA et al., 2003).

Os resultados com o antifúngico padrão cetoconazol foram de CIM 0,040 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CFM = 0,058 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Apesar dos isolados serem suscetíveis ao antifúngico, a importância dos estudos com o extrato etanólico de alecrim é achar uma possível nova fonte com poder antifúngico e com menos efeitos colaterais, já que essa enfermidade é recidivante e relacionada a imunidade do animal (ROSA et al. 2006), e sabe-se da toxicidade inerente aos fármacos antifúngicos.

4. CONCLUSÕES

O extrato etanólico de alecrim possui, *in vitro*, potencial fungistático e fungicida, e a partir de mais estudos pré-clínicos, em relação a atividade antimicrobiana como a toxicidade, pode ser uma nova opção terapêutica no tratamento da malasseziose canina.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANSARULLAH, R.N.J. et al. Antihyperlipidemic potential of a polyherbal preparation on triton WR 1339 (Tyloxapol) Induced hyperlipidemia. **International Journal of Green Pharmacy**, v.3, n.2, p.119–124, 2009.

ASHBEE, H.R. Update on the genus *Malassezia*. **Medical Mycology**, v.45, p.287-303, 2007.

BAI, N.; HE, K.; ROLLER, M.; LAI, C.; SHAO, X.; PAN, M.; HO, C. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, 58:5363–5367, 2010.

CARDOSO, R. L.; MABONI, F.; MACHADO, G.; ALVES, S. H.; VARGAS, A. C. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. **Veterinary Microbiology**. 432–434, 2010.

CECHINEL FILHO, V. Principais avanços e perspectivas na área de produtos naturais ativos: estudos desenvolvidos no NIQFAR/Univali. **Química Nova**, v.23, p. 680, 2000.

CHALCHAT, J. C.; GARRY, R. P.; MICHET, A.; BENJILALI, B.; CHABART, J. L. Essencial. Oils Rosemary (*Rosmarinus officinalis*, L.) the chemical composition of

oils of various. (Morocco, Spain, France). **Journal of Essential Oil Research**, n.5, p.613-8, 1993.

CLEFF, M.B. et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.1, p.43-49, 2012.

CLSI.M27-A3. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of 304 Yeasts. Third Edition. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, Wayne, PA. 2008.

FARIAS, M. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p.262-288. 2003.

HAIDA, K. S., PARZIANELLO, L., WERNER, S., GARCIA, D. R., INÁCIO, C. V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arq. Ciênc. Saúde Unipar, Umuarama**, v. 11, n. 3, p. 185-192, set./dez. 2007.

LEITE, C. A. L.; ABREU, V. L. V.; COSTA, G. M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** 55:102-104, 2003.

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

MACHADO, M. L. S. et al. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.32, p.225-232, 2004.

ROSA, C. S. et al. *Malassezia pachydermatis* no tegumento cutâneo e meato acústico externo de felinos hígidos, otopatas e dermatopatas, no município de Pelotas, RS, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 34, p. 143-147, 2006.

SANTIN, R. et I. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 66, p.367-373, 2014.

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

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIN, N. Especiarias: uma alternativa para o controle de qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene alimentar**, v.17, p.28-42, 2003.

WALLER, S. B. Potencial Anti-*Sporothrix* spp. de plantas da família laminaceae. Porto Alegre, Brasil, 129 p. (M. Sc. Thesis. Faculdade de Veterinária, UFRGS), 2015.