

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE COMPOSTOS COM EXTRATOS VEGETAIS FRENTE À LEVEDURA *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLADAS DE CÃES COM OTITE EXTERNA

RISCIELA SALARDI ALVES DE BRITO¹; MÁRCIA KUTSCHER RIPOLL²; ANTÔNIO
GONÇALVES DE ANDRADE JÚNIOR³; ROGÉRIO ANTÔNIO FREITAG⁴; RENATO
VIANNA⁵, MÁRCIA DE OLIVEIRA NOBRE⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – riscIELa234@yahoo.com.br

² Universidade Federal do Rio Grande do Sul – marciaripoll@hotmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – antonio_3@icloud.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – rafreitag@gmail.com

⁵Universidade Católica de Pelotas – renatoviannafarm@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – marciaonobre@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A *Malassezia pachydermatis* é um microrganismo comensal da pele e conduto auditivo de cães e gatos o qual se torna um patógeno oportunista em condições favoráveis para seu desenvolvimento e proliferação. A manifestação como patógeno depende do estado imunológico, condições hormonais e alérgicas do hospedeiro (PETROV, 2018).

A otite externa associada a *M.pachydermatis* é encontrada entre 50 e 82,7% do cães sendo caracterizada pela presença de eritema, exsudato ceruminoso escuro com presença de prurido. Quando as alterações tornam-se crônicas observa-se sinais clínicos de hiperqueratose, hiperpigmentação e liquenificação (PETROV, 2013; CASTELLÁ, 2019).

As infecções por esses organismos são geralmente tratadas com antifúngicos, mas o surgimento de resistência fúngica já foi descrito *in vitro* aos antifúngicos azólicos em amostras isoladas de cães com dermatite, assim como estudos mostram que amostras de *Malassezia* isoladas de animais com lesões de dermatite são menos suscetíveis a alguns antifúngicos do que amostras coletadas de animais saudáveis (CAFARCHIA, 2012; NIJIMA, 2011).

O interesse a desenvolvimento de produtos vegetais na medicina veterinária tem aumentado, tornando uma possibilidade de utilização para prevenir a formação de cepas resistentes (SHIN, 2018). Os extratos vegetais utilizados em nossa formulação são conhecidos pela ação na cicatrização de feridas assim como na redução microbiana (TILMMAN, 2018; CAPELLA, 2016).

Os adjuvantes têm sido utilizados para aumentar a ação dos microbianos, agindo por diversas vias e melhorando a eficiência dos antibióticos e antifúngicos utilizados. Neste contexto, objetiva-se avaliar o potencial antifúngico frente a *Malassezia pachydermatis in vitro* de duas soluções otológicas compostas por extratos vegetais e adjuvantes.

2. METODOLOGIA

Obtenção das soluções otológicas

As amostras vegetais utilizadas para a formulação dos extratos foram adquiridas comercialmente de uma empresa distribuidora de produtos naturais, com certificação de origem das sementes e ficha técnica. Para formular o produto foram produzidos extratos etanoicos das plantas. As sementes foram pulverizadas em moinho de facas

sendo pesadas e acondicionadas em um balão de Erlenmeyer e, adicionado Etanol PA ao balão e este levado ao ultrassom, sendo sonificado por 30 minutos. Ao final da extração os extratos foram filtrados em rotaevaporador para retirar o solvente. Após os extratos foram armazenados em frascos âmbar hermeticamente fechados e conservados até sua utilização. Após a finalização os extratos foram utilizados para compor as formulações soluções otológicas LCFO 1003 e LCFO 1004.

Teste de susceptibilidade antifúngica

Para este estudo foram obtidos 21 isolados de *M. pachydermatis* de cães com sinais clínicos de otite externa. As amostras foram semeadas em placas de Petri com Ágar Saboraud acrescidas de cloranfenicol e incubadas em estufa microbiológica a 37°C durante 48 horas.

Para avaliação da atividade antifúngica foi utilizada a técnica de microdiluição de caldo presente no documento M27A3 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) com adaptações para o uso em leveduras *M. pachydermatis* e fitofármacos (EICHENBERG, 2003; NASCENTE, 2003; SANTIN, 2014).

Os inóculos foram preparados a partir de colônias jovens com 48 horas de crescimento em ágar saboraud acrescidos de cloranfenicol. As colônias foram suspensas em solução salina 0,9% e homogeneizadas em vórtex sendo ajustadas quanto a turbidez. A partir desta solução foi realizada uma diluição de 1:50 em solução salina e após uma diluição de 1:20 em caldo Saboraud, a qual foi distribuído em alíquotas de 100µl nos poços das microplacas. Os produtos LCFO 1003 e LCFO 1004 foram testados e duplicata nas concentrações de 100% a 3,12%.

Após o preenchimento as microplacas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 48 horas para a leitura da Concentração Inibitória Mínima (CIM). Em seguida foram transferidos 0,07µL de cada poço para placas de Petri contendo ágar saboraud acrescidos de cloranfenicol, sendo posteriormente incubados a 37°C por 48 horas para a leitura da Concentração Fungicida Mínima (CFM).

A leitura da CIM foi feita por método visual considerando a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento da levedura. Para determinação da CFM, também pelo método visual foi considerada a menor concentração do extrato que não permitiu o crescimento da levedura. Para a análise estatística foi realizado o teste de wil coxon.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os testes antifúngicos em microdiluição em caldo demonstram a atividade antifúngica de ambas soluções otológicas 1003 e 1004 frente ao 21 isolados apresentando variação da CIM para as soluções otológicas 1003 e 1004 de 6,25% a 100% (Tabela 1). Sendo a média da Concentração inibitória mínima do LCFO 1003 21,72% e a média do LCFO 1004 25,89%. Já para o CFM a média da solução LCFO 1003 foi de 34,06% e da solução LCFO 1004 de 42,85%. Através do teste de Wil coxon para amostras pareadas, observou-se que não houve diferença estatística entre as soluções otológicas, apresentando valor de p 0,19 para o CIM e valor de p 0,230 para o CFM.

O uso de princípios ativos oriundos de plantas está cada vez mais conquistando espaço e interesse dentro da indústria farmacêutica veterinária como estimulantes para novas moléculas com propriedades farmacológicas e químicas. A levedura *Malassezia pachydermatis* é um dos principais fatores perpetuantes da otite externa canina estando presente em até 82,7% dos casos. Estudos de susceptibilidade de extratos

vegetais já demonstram eficiência frente a levedura como *Artemisia sieberi*, *Heracleum persicum*, *Mentha spicata*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus kotschyanus* e *zataria multiflora* (KHOSRAVI,2015).

Nesse estudo, o valor da concentração inibitória mínima, variou de 6,25 % há 100% para ambos compostos LCFO 1003 e LCFO 1004, são valores considerados baixos frente a *M.pachydermatis* corroborando com a literatura, em um estudo avaliando seis extratos vegetais frente a cepas de *Malassezia* sp encontrou os seguintes valores de CIM: *Zataria multiflora* 60 ug/ml, *Thymus kotschyanus* 100 ug/ml, *Mentha spicata* 150 ug/ml, *Artemisia sieberi* 80 ug/ml, *Rosmarinus officinalis* 360 ug/ml e *Heracleum persicum* 580 ug/ml (KHOSRAVI, 2015), apresentando variação nos valores semelhantes a desse estudo.

A eficiência dos compostos 1003 e 1004 pode ser justificável devido à alta concentração de terpenos encontradas em ambos os extratos etanólicos das plantas utilizadas, outros compostos ricos em terpenos também demonstraram eficiência *in vitro* frente a leveduras do gênero *Malassezia* como descrito por HAN (2015) o qual encontrou uma concentração inibitória mínima de 0,63%.

Tabela 1 - Atividade in vitro dos compostos 1003 e 1004 frente aos 21 isolados da levedura *Malassezia pachydermatis*

Isolados	LCFO 1003		LCFO 1004	
	CIM (%)	CFM (%)	CIM (%)	CFM (%)
1	25	100	25	50
2	25	50	12,5	50
3	12,5	25	12,5	25
4	12,5	50	25	50
5	12,5	25	25	25
6	12,5	25	25	25
7	25	50	25	25
8	100	-	12,5	100
9	100	100	100	100
10	12,5	100	12,5	25
11	6,25	25	6,25	25
12	12,5	12,5	25	25
13	6,25	6,25	12,5	25
14	6,25	12,5	25	50
15	12,5	12,5	12,5	25
16	12,5	12,5	12,5	25
17	12,5	25	100	100
18	12,5	12,5	25	50
19	12,5	12,5	25	50
20	12,5	12,5	12,5	25
21	12,5	12,5	12,5	25

Outro fator que contribui para a atividade antifúngica é o uso dos adjuvantes que funcionam de diferentes maneiras, atuando como inibidores de enzimas que inativam antibióticos, inibidores de bomba de efluxo, permeabilizadores de membrana, dispersores de biofilmes, inibidores de elementos de resistência a antibióticos e inibidores

de bactérias por vias fisiológicas celulares. Dessa forma, acredita-se que os adjuvantes tenham a ação de potencializar o efeito dos extratos vegetais sobre os microrganismos presentes em casos de otite externa canina.

4. CONCLUSÕES

Os compostos 1003 e 1004 apresentam potencial antifúngico frente a levedura *M.pachydermatis*, estimulando a continuidade em testes in vivo em cães.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L. A.; IATTA, R. et al. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. **Veterinary microbiology**, v. 155, n. 2-4, p. 395-398, 2012.
- CAPELLA, S.; TILLMANN, A.; FÉLIX, A. et al. Potencial cicatricial da Bixa orellana L. em feridas cutâneas: estudo em modelo experimental. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 68, p. 104-112, 2016.
- NASCENTE, P. S. **Estudo da população de *Malassezia pachydermatis* em otite externa canina e avaliação da sensibilidade in vitro e in vivo frente a antifúngicos**. 2006. 135f. Tese (Doutorado em ciências) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.
- NIJIMA, M.; KANO, R.; NAGATA, M. et al. Um isolado de *Malassezia pachydermatis* resistente ao azol. **Veterinary Microbiology**, v. 149, n.1-2, p. 288-290, 2011.
- SARIDOMICHELAKIS, M. N.; FARMAKI, R.; LEONTIDES, L. S. et al. Etiologia da otite externa canina: estudo retrospectivo de 100 casos. **Dermatologia veterinária**, v. 18, n. 5, p. 341-347, 2007.
- PETROV, V.; ZHELEV, G.; MARUTSOV, P. et al. Microbiological and antibacterial resistance profile in canine otitis externa – A comparative analysis. **Bulgarian Journal of Veterinary Medicine**, v. 22, n. 4, p. 447-456, 2019.
- PETROV, V.; MIHAYLOV, G.; TSACHEV, I. et al. Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 164, n. 1, p. 18-22, 2013.
- TILLMANN, M. T.; MENDES, C. B. M.; FISCHER, G. et al. *Triticum aestivum* in open skin wounds: cytotoxicity and collagen histopathology. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 1547-1554, 2018.