

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

EFEITO FITOTERÁPICO IN VITRO DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS RADDI* FRENTE À *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* ISOLADA DE OTITE FÚNGICA CANINA

Poliana da Silva Rocha, Karina Gerhardt Pereira, Joicy Servo Nascimento, Cristhiane Ferreira Mol Mendes, Ítalo Câmara de Almeida, Dirlei Molinari Donatele.

Universidade Federal do Espírito Santo, Alto Universitário, s/n, Guararema, 29500-000, Alegre- ES, Brasil, poliana.s.rocha@edu.ufes.br, karina.ufes@hotmail.com, joicy.nascimento@edu.ufes.br, cristhiane.mendes@edu.ufes.br, canarinho86@gmail.com, dirleidonatele@gmail.com.

Resumo

O presente trabalho é um estudo sobre a ação antifúngica do óleo essencial de fruto da *Schinus terebinthifolius Raddi* sobre a *Malassezia pachydermatis*, levedura comensal da pele e conduto auditivo dos animais capaz de tornar-se patogênica propiciando casos de otites e dermatites. O tratamento convencional baseia-se no uso de derivados azólicos, entretanto, casos de resistência e fracasso terapêutico tem sido recorrentes, por isso, torna-se necessário meios alternativos de tratamento como a fitoterapia. *S. terebinthifolius Raddi* tem sido reconhecida como uma espécie vegetal de interesse científico devido ao seu potencial antimicrobiano. Para avaliar a atividade antifúngica, foi utilizado o método ágar- poço para realização do antifungigrama. Diferentes concentrações do óleo foram testadas frente à *M. pachydermatis* isolada de amostra de cão diagnosticado com otite, onde os diâmetros dos halos de inibição foram medidos correlacionando-os com efeito inibitório sobre o crescimento do patógeno. As concentrações do óleo demonstraram efeito positivo, indicando ser uma boa alternativa para o tratamento de Otite fúngica por *M. pachydermatis* em cães.

Palavras-chave: Fitoterapia. Óleo essencial. Aroeira. Animais de companhia. Otopatia.

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde- Medicina Veterinária.

Introdução

A Otite externa é em uma enfermidade dermatológica importante na clínica de pequenos animais, resultado de uma inflamação da orelha externa, que atinge o pavilhão auricular até a parede externa da membrana timpânica (SOUZA; LENZI; KITAMURA, 2017). A classificação da Otite é dada de acordo com a região anatômica afetada (interna, média ou externa), abrangência (uni ou bilateral) e permanência (aguda ou crônica) (LOPEZ; FERNANDES, 2015). Além disso, essa doença conta com vários fatores predisponentes, primários, secundários e perpetuantes (CUSTÓDIO, 2019). Dentre os fatores secundários, que inclui os fungos, pode-se destacar a levedura *Malassezia pachydermatis*, um comensal da mucosa e pele dos cães capaz de tornar-se patogênico quando dadas as condições favoráveis ao seu crescimento (CHEN, 2005). Somente essa espécie cresce em meios de cultivos laboratoriais sem enriquecimento de lipídeos (QUINN *et al.*, 2005).

O tratamento frequentemente é realizado por via tópica ou sistêmica com o uso de antifúngicos azóis, como Clotrimazol, Cetoconazol e Miconazol, podendo ser associado a antibióticos e glicocorticoides para conter a infecção bacteriana e a inflamação (VELEGRAKI *et al.*, 2015). Entretanto, casos de resistência têm sido frequentemente relatados, somado a isso, as recidivas são recorrentes (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Schinus terebinthifolius Raddi, também conhecida como Aroeira, é uma planta pertencente à família *Anacardiaceae* muito empregada medicinalmente na região do Nordeste brasileiro para tratar várias enfermidades. Diferentes substâncias que compõe o seu extrato possuem propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias, e foi revelada, *in vitro*, uma ação significativa frente a variadas

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

espécies de fungos e bactérias (PRASHAR *et al.*, 2003). Também foi relatada atividade mutagênica em células cancerígenas nos trabalhos de Bendaoud *et al.* (2010) e Suffrendini *et al.* (2007).

Ainda, já foi demonstrado potencial inibitório do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius Raddi* frente a agentes etiológicos prevalentes na contaminação otológica, incluindo a *Malassezia sp.* (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Há descrição de tratamentos de animais com a utilização do óleo de aroeira para manifestação de dor, secreção e prurido, no qual acarretou uma redução dos sintomas clínicos (PRASHAR *et al.*, 2003; NASCENTE *et al.*, 2004). Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o potencial antifúngico *in vitro* do óleo essencial de *Schinus terebinthifolius Raddi* em diferentes concentrações frente a cultura de *Malassezia pachydermatis* provenientes de amostra de animais diagnosticados clinicamente com otite fúngica, na busca de alternativas ao tratamento convencional.

Metodologia

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Inspeção de Produtos de Origem Animal do Hospital Veterinário- UFES, em Alegre, ES. As ações realizadas para esse estudo receberam autorização da Comissão de Ética no Uso de Animais, processo registrado sob o nº 010/2018. O óleo foi doado e extraído pelo laboratório de Plantas Medicinais da EPAMIG Sudeste, em Viçosa, MG. Este óleo foi diluído com álcool e água destilada na proporção 1:1 e depois foram feitas as seguintes concentrações: 50%; 25%; 12,5%; 6,25 %, do óleo, que foi identificado como 100%.

A identificação e isolamento de *Malassezia pachydermatis* foi realizada de acordo com a metodologia utilizada por Nascente *et al.* (2010). Os isolados de *M. pachydermatis* foram obtidos de amostra de cerúmen de cão com diagnóstico de otite externa fúngica. Para a coleta, utilizou-se swab estéril friccionando-se a região externa do meato acústico da orelha. A partir da citologia de ouvido, utilizando-se coloração de eosina e hematoxilina através de microscopia óptica (aumento de 1000x) e óleo de imersão, buscava-se células leveduriformes com brotamento monopolar, coradas, compatíveis com *Malassezia spp.* Após essa identificação, as amostras de cerúmen foram semeadas em placa de Petri contendo ágar Sabouraud dextrose e posteriormente incubadas em estufa a temperatura de 37°C para o isolamento de *M. pachydermatis*.

Para o isolamento e purificação das leveduras replicações de colônias foram realizadas sob as mesmas condições com acompanhamento diário das características macroscópicas das colônias e morfologia celular pelo esfregaço dos cultivos. Após o período de cultivo e replicação, foram feitos os testes para avaliação do efeito antifúngico de *Schinus terebinthifolius Raddi* frente a *Malassezia pachydermatis*.

Para a realização do preparo inóculo fúngico, uma colônia foi coletada e transferidas para tubos com solução salina estéril NaCl 0,85% (p/v) até atingir a turbidez equivalente a escala de McFarland 0,5 (aproximadamente 1×10^8 UFC/mL) e semeadas na superfície ágar Sabouraud dextrose.

Posteriormente, foi feita a perfuração de orifícios no meio solidificado com perfurador de 6 mm de diâmetro. Foi vertido em cada placa de Petri 1 ml da solução salina contendo *M. pachydermatis*. Nos orifícios foi realizada a deposição de 20 microlitros do óleo em suas diferentes concentrações (100%, 50%, 25%, 12,5% e 6,25%). Os ensaios foram realizados em triplicata, acompanhados de controle positivo com o antifúngico Cetoconazol e controle negativo com álcool + água destilada (1:1).

A análise dos resultados foi quantitativa, através da observação de halo de inibição medido com paquímetro, e qualitativa, pela observação de sensibilidade ou resistência. Assim, a sensibilidade da amostra foi considerada para medidas: Sensível (S), para os poços ou filtros que apresentaram halos maiores ou iguais a 12 mm, Intermediário (I) para resultados parciais entre 8 mm e 11 mm e Resistente (R) para halos de raio menor que 8 mm.

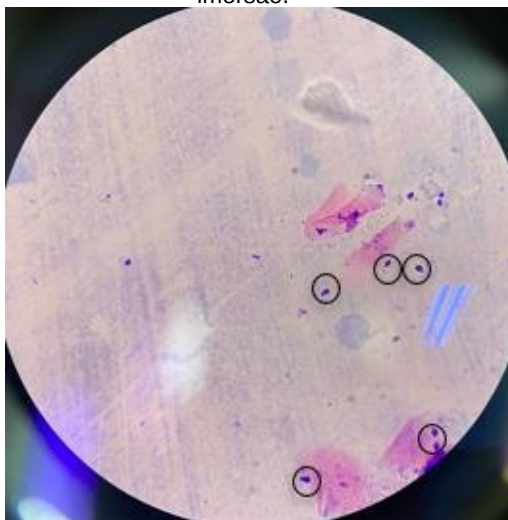
Resultados

O material coletado foi cultivado, isolado e analisado através de esfregaço corado com panóptico para identificação do agente. Foi possível encontrar células de leveduriformes com brotamento monopolar características compatíveis com *Malassezia spp* como mostra a Figura 1.

Figura 1 - Identificação e isolamento das leveduras. Fotografia do esfregaço de uma colônia de *Malassezia pachydermatis* isolada e cultivada em meio ágar Sabouraud dextrose sem suplementação de lipídeos. A

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

identificação foi possível pelo aspecto leveduriforme com brotamento monopolar. Aumento de 1000 X em óleo de imersão.



Fonte: A autora.

Os resultados dos efeitos da ação de *Schinus terebinthifolius Raddi* em diferentes concentrações frente a *Malassezia pachydermatis* estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados da ação antifúngica do óleo essencial do fruto de *Schinus terebinthifolius Raddi* em diferentes concentrações frente à *Malassezia pachydermatis*. Medidas dos halos de inibição em milímetros (mm) e descrição de sensibilidade e resistência. Antifúngico Cetoconazol como controle positivo e água + álcool na proporção 1:1 no controle negativo. C+: controle positivo; C-: controle negativo; (S): sensível; (I): intermediário.

Placa	[] 100%	[] 50%	[] 25%	[] 12,5%	[] 6,25%	C+	C-
1	20 (S)	18 (S)	14 (S)	16 (S)	12 (S)	20 (S)	0
2	19 (S)	17 (S)	17 (S)	15 (S)	14 (S)	18 (S)	0
3	17 (S)	17 (S)	15 (S)	13 (S)	12 (S)	18 (S)	0

Fonte: A autora

Discussão

Schinus terebinthifolius Raddi apresentou ação antifúngica contra a *Malassezia pachydermatis* em todas as concentrações (100%; 50%; 25%; 12,5%; 6,25%), sendo os halos de inibição na concentração de 100% e 50% do óleo semelhantes aos halos do antifúngico convencional, os quais apresentaram maior potencial de inibição. A ação fungicida de *S. terebinthifolius Raddi* apresentando halos inibitórios análogos aos registrados para os derivados azólicos foi retratada por Oliveira *et al.* (2018), que observaram a atividade antifúngica do óleo essencial e extratos de *S. terebinthifolius* em *Malassezia furfur*, apresentando zona de inibição similar à da Nistatina (22,3 mm), um antifúngico convencional, corroborando com o presente estudo.

Os diâmetros das zonas de inibição similares nas concentrações de 100% e 50% podem ser pela melhor difusão dos compostos em ágar, tal fato pode estar associado a relação solvente: soluto, do qual a menor quantidade de solvente em relação ao soluto pode auxiliar a distribuição das moléculas na placa, conseqüentemente, o raio de ação ser maior.

A ação fungicida dos azólicos utilizados no tratamento convencional contra *M. pachydermatis* ocorre pela ação sobre a parede celular, já que inibem a síntese da produção de substâncias, tornando então, o fungo inviável (SPINOSA; GÓRNIK; BERNARDI, 2011), de modo de ação parecido, Romero *et al.* (2012) relatou um dos mecanismos de ação da inibição de microrganismos por óleos essenciais, o qual está relacionado ao efeitos tóxicos aliados ao caráter lipofílico dos óleos frente a estrutura e função da membrana celular do microrganismo. A afinidade com lipídeos propicia aos óleos essenciais

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

a passagem por partição de fase aquosa para o interior da membrana. Assim, há expansão da mesma, aumento de fluidez e permeabilidade, ocasionando a saída dos componentes essenciais para a sobrevivência do microrganismo.

Da mesma maneira, no estudo de Thakre *et al.* (2018) da ação do Limoneno, um dos principais constituintes do óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi, frente a isolados de *Candida albicans*, foi suposto que o mesmo originou danos na membrana e parede celular gerando estresse oxidativo, consequentemente, dano ao DNA e indução de apoptose por via dependente da caspase e independente. Ainda, Cox *et al.* (2000); Lima *et al.* (2005); Tangarife- Chestnut *et al.* (2011) reportaram a ação do alfa- pineno na integridade celular impedindo a respiração e transporte de íons, assim como aumento de permeabilidade da membrana celular da *C. albicans*. Assim, pode- se considerar esses mecanismos como prováveis fatores responsáveis pela ação antifúngica encontrada no presente estudo, visto que houve inibição da *M. pachydermatis* frente ao óleo essencial de *S. terebinthifolius* Raddi.

De acordo com Bakkali *et al.* (2008), a teoria preferencialmente aceita a respeito da ação fungicida dos óleos essenciais deve-se ao caráter lipofílico, que permite a passagem das membranas de maneira mais simples, causando aumento de permeabilidade, perda de íons, destruição da bomba de prótons e, por consequência, morte celular. Essas hipóteses podem justificar a considerada ação antifúngica do óleo testado no presente estudo, caracterizada pela inibição do fungo em todas as concentrações testadas, indicando que os componentes presentes podem possuir compostos cruciais para a atividade lipofílica, inibitória, prejudicial ao fungo. A inibição do crescimento da *M. pachydermatis* foi diretamente proporcional à concentração do óleo.

Oliveira *et al.* (2013) também observaram efeito fungicida do óleo essencial de *S. terebinthifolius* a partir da inibição de crescimento micelial, causando efeito na esporulação do fungo, sendo mais uma hipótese para a ação antifúngica encontrada neste trabalho.

O presente estudo não analisou a ação dos componentes do óleo sobre a morfologia do fungo e as prováveis mudanças da parede celular que pudesse ser pela ação de *S. terebinthifolius* Raddi, entretanto, não se descarta uma possível avaliação futura para melhor entendimento da ação desses compostos frente a sobrevivência de *Malassezia pachydermatis*.

Conclusão

O óleo essencial de *Schinus terebinthifolius* Raddi na metodologia testada demonstrou efeitos inibitórios sobre *Malassezia pachydermatis*. A associação de óleo essencial do fruto de *S. terebinthifolius* com a terapia convencional podem se tornar opção terapêutica em quadros de otites e dermatites por *M. pachydermatis*. Todas as concentrações testadas demonstraram efeitos positivos, entretanto, não foi possível saber se houve uma boa diluição com o método testado, por isso seria importante o estudo com a utilização de novos métodos de diluição do óleo. De acordo com os resultados desse estudo, novas avaliações podem ser feitas para melhor compreensão da ação de *S. terebinthifolius* e os seus componentes frente a *M. pachydermatis*, como o sítio de ação atuante, e as alterações estruturais provocadas no fungo.

Referências

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. 2008; 46: 446-475.

BENDAOU, H.; ROMDHANE, M.; SOUCHARD, J.P.; CAZAUX, S.; BOUAJILA, J. Composição química e anticancerígena e atividade antioxidante dos óleos essenciais das bagas de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi. J Comida e atividades biológicas dos frutos da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi). S Afr J Bot. 2017; **Amazônia vazia de soluções? Desenvolvimento moderno baseado na biodiversidade**. Rio de Janeiro: José Ciência. 2010; 75 (6): C466-C472. ISSN: 1750-3841.

CHEN, T. A.; HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary dermatology**, 16(1), 4-26, 2005.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

COX, S.; MANN, C.; MARKHAM, J.; BELL, H.; GUSTAVO, J.; WARMINGTON, J.; WYLLIE, S. O modo de ação antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (óleo da árvore do chá). **J. Appl. Microbiol.** 2000, 88, 170-175.

CUSTODIO, C. S *et al.* Otite externa em cães: uma revisão de literatura. 2019. 43 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária)- Universidade Federal de Santa Catarina, Curitiba.

Lima, I.O.; de Araújo G. Oliveira, R.; de O. Lima, E.; de Souza, E.L.; Farias, N.P.; de Fátima Navarro, D. Efeito inibitório de alguns fitoquímicos no crescimento de leveduras potencialmente causadoras de infecções oportunistas. **Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas** 2005, 41, 199–203.

LOPEZ, D. C. L.; FERNANDES, T. P. Avaliação audiológica em animais com perda auditiva condutiva através da audiometria de impedância: Timpanometria e reflexo acústico – Revisão de Literatura. **MedVep Dermato**, v.13, n.43, p. 46-53, 2015.

MATSUO, A.L., FIGUEIREDO, C.R., ARRUDA, D.C., PEREIRA, F.V., SCUTTI, J.A.B., MASSAOKA, M.H., TRAVASSOS, L.R., SARTORELLI, P., LAGO, J.H.G. Alpha-Pinene isolated from *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) induces apoptosis and confers anti-metastatic protection in a melanoma model. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 411, n.2, p. 449–454, 2011.

NASCENTE, O. 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**; 26(2): 79-82, 2004.

NASCENTE, P. S; SANTIN, R; MEINERZ, A. R.M.; MARTINS, A. A.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Estudo da frequência de *Malassezia pachydermatis* em cães com otite externa no Rio Grande do Sul. **Ciência Animal Brasileira**, v. 11, n. 3, p. 527-536, Out. 2010.

OLIVEIRA JUNIOR, L.F.G; SANTOS, R.B; REIS, F.O; MATSUMOTO, S.T; BISPO, W.M.S; MAVHADO, L.P; OLIVEIRA, L.F.M. Efeito fungitóxico do óleo essencial de aroeira da praia (*Schinus terebinthifolius* RADDI) sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. **Revista Brasileira. Pl. Med., Botucatu**, v15, n,1, p.150-157, 2013.

OLIVEIRA, DMNM *et al.*, Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de aroeira (*Schinus terebinthifolius*, Raddi), em cães com otite externa. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, Recife, v. 26, p. 79-82, 2004.

OLIVEIRA, L. C.; CARVALHO, C.; LEITE, C. A. L.; BRILHANTE, R. S. N. (2008). Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **Canadian Veterinary Journal**, 49(8), 785–788.

OLIVEIRA, M. S. *et al.*, Composição química e atividades antifúngicas e anticancerígenas de extratos e óleos essenciais do fruto *Schinus terebinthifolius* Raddi. 2018.

PRASHAR, A.; HILI, P.; VENESS, R. G.; EVANS, C. S. 2003. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**. v.63, p. 569– 575.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K; CATER, M. E; DONNELLY, W. J; LEONAR, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 512p.

A era digital e suas implicações sociais: Desafios e contribuições

ROMERO AL; ROMERO RB; SILVA EL; DINIZ SPS de S; DE OLIVEIRA RR; VIDA JB. Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de Origanum vulgare Sobre Fungos Fitopatogênicos. **J. Health Scie.** [Internet]. 2º de julho de 2015 [citado 20º de agosto de 2023];14(4). Disponível em: <https://journalhealthscience.pgsscoqna.com.br/JHealthSci/article/view/865>. Acesso em: 20 de ago 2023.

SANTOS, M. R. A.; LIMA, R. A.; SILVA, A. G.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; FACUNDO, V. A. (2013). Composição química e atividade inseticida do óleo essencial de Schinus terebinthifolius Raddi (Anacardiaceae) sobre a broca-do-café (Hypothenemus hampei) Ferrari. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, 15(4), 757–762. DOI: <https://doi.org/10.1590/s1516-05722013000500017>.

SILVA, M. A.; Sousa, B. M. P; ZANINI, S. F.; COLNAGO, G. L.; NUNES, L. C.; RODRIGUES, M. R. A.; FERREIRA, L. (2011). Óleo essencial de aroeira-vermelha como aditivo na ração de frangos de corte. **Ciência Rural**, 41(4), 676–681. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0103-84782011005000034>.

SOUZA, G. A.; LENZI, F. L.; KITAMURA, E. A. Abordagem Diagnóstica da Otite Externa Canina-Relato de Caso. In: **Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão** (2017), 10., 2017, Araquari. Anais da Semana de Ensino, Pesquisa e Extensão. Araquari: Even3, 2017. p. 1 - 1.

SPINOSA, Helenice de Souza; GÓRNIK, Silvana Lima; BERNARDI, Maria Martha.

SUFREDINI, I. B; PACIÊNCIA, M.L.B; VARELLA, A. D, YOUNES, R. N. Atividade citotóxica in vitro de extratos vegetais brasileiros contra cânceres sólidos de pulmão, cólon e SNC e leucemia. **Fitoterapia**. 2007; 78 (3): 223-226. ISSN: 0367-326X.

TANGARIFE-CHESTNUT, V.; CORREA-ROYERO, J.; SHOE-LONDON, B.; DURAN, C.; STANCHENKO, E.; Faixa de Mesa, AC. Atividade anti-Candida albicans, citotoxicidade e interação com antifúngicos de óleos essenciais e extratos de plantas aromáticas e medicinais. **Infecção** 2011, 15, 160-167.

THAKRE, A.; ZORE, G.; KODGIRE, S.; KAZI, S.; MULANGE, S.; PATIL, R *et al.*, (2018). Limonene inhibits Candida albicans growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**. 56, 565–578. <https://doi.org/10.1093/mmy/myx074>.

VELEGRAKI, A.; CAFARCHIA, C.; GAITANIS, G.; LATTA, R.; BOEKHOUT, T. (2015). Malassezia infections in humans and animals: pathophysiology, detection, and treatment. **PLoS Pathog**, 2015 Jan 8; 11(1):e1004523. doi 10.1371/journal.ppat.1004523. PMID: 25569140; PMCID: PMC4287564.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que fomentou a pesquisa; à Universidade Federal do Espírito Santo, ao Hospital Veterinário da Ufes e ao laboratório de Plantas Medicinai

s da EPAMIG Sudeste.