

DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E CITOTÓXICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Schinus terebinthifolius* (AROEIRA-MANSA)

CLAUDIA GIORDANI¹; ROSEMA SANTIN²; LUCIANA LAITANO DIAS DE CASTRO³; ISABEL MARTINS MADRID⁴; MARIA ELISABETH AIRES BERNE⁵; MARLETE BRUM CLEFF⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – UFPel – claarte@hotmail.com

² Instituto de Desenvolvimento Educacional do Alto Uruguai – IDEAU – seminhavet@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – UFPel – luciana_ldc@hotmail.com

⁴Secretaria Municipal de Saúde de Pelotas – imadrid_rs@yahoo.com.br

⁵Universidade Federal de Pelotas – UFPel – bernemea@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – UFPel – emebrum@bol.com.br

1. INTRODUÇÃO

Malassezia pachydermatis é uma levedura frequentemente isolada do conduto auditivo e tegumento de animais, podendo atuar como patógeno oportunista (MACHADO et al., 2003; MENDES et al., 2011). Com relação à terapia, as principais problemáticas referem-se à frequência de recidivas, infecções concomitantes, tratamento prolongado, associado com toxicidade e resistência aos fármacos antifúngicos (NOBRE et al., 1998; SIDRIM & ROCHA, 2004).

O uso das plantas medicinais e extratos vegetais mesmo tendo alcançado expressivos avanços científicos, ainda tem sido, em sua maioria, conforme a indicação popular, podendo expor a população a possíveis efeitos tóxicos (ALVIM et al., 2006; AGRA et al., 2008).

Desta forma, objetivou-se determinar o potencial antifúngico em isolados clínicos de *M. pachydermatis* e determinar citotoxicidade do extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*.

2. METODOLOGIA

Para o preparo do extrato vegetal, utilizou-se 100g de folhas secas coletadas na cidade de Pelotas-RS, e adicionou-se 500mL de álcool de cereais 70%. Esta mistura permaneceu por um período de sete dias em vidro estéril hermeticamente fechado, em temperatura ambiente e com agitação manual diária. Após este período, a amostra foi filtrada e o volume inicial restituído com álcool de cereais 70%, resultando em uma tintura (SCHIEDECK et al., 2008). Para obtenção do extrato hidroalcoólico foi utilizado o rotaevaporador à vácuo com banho de aquecimento sob temperatura de 40°C. Após, restituindo o volume inicial com água destilada estéril, testadas seis concentrações de 100 a 3,12mg/mL em duplicata.

Foram utilizados 48 isolados de *M. pachydermatis*, sendo de otite (n=38) e de dermatite (n=10) em cães, estocados no Laboratório de Micologia Veterinária - UFPel. O método utilizado para avaliação da atividade antifúngica foi a microdiluição em caldo baseado no Clinical and Laboratory Standards Institute, documento M27-A3 (2008), com modificações para fitofármacos e *M. pachydermatis* (EICHENBERG et al., 2003; NASCENTE et al., 2003).

O inóculo fúngico foi preparado a partir de colônias jovens com 24 horas (h) de crescimento, sendo homogenizada uma alçada da colônia em solução salina estéril. Cada inóculo foi ajustado em espectrofotômetro com comprimento de onda de

320nm e transmitância de 65-70%. Para o teste de microdiluição em caldo realizou-se a primeira diluição do inóculo padronizado com solução fisiológica estéril (1:50) e, a partir desta, uma diluição 1:20 utilizando meio Sabouraud líquido. Os resultados foram expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM), realizada pelo método visual, sendo a menor concentração do extrato capaz de inibir o crescimento fúngico; e em Concentração Fungicida Mínima (CFM), determinada através da semeadura de 10µL das suspensões das microplacas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol, incubadas a 35°C por 48h, sendo a menor concentração dos extratos que não apresentou crescimento da levedura.

O efeito de citotoxicidade do extrato foi avaliado pelo teste do MTT conforme MOSMANN (1983) com adaptações. O teste foi realizado em células VERO que foram mantidas em contato com as 12 concentrações do extrato hidroalcoólico (100 a 0,045mg/mL) durante 24h. Posteriormente, 50 µl de MTT foram adicionados e mantidos por 2h e 30min a 37° C e 5% de CO₂. Após a remoção desta solução foi adicionado 50µl de dimetilsulfóxido em cada poço e a leitura realizada em leitor de ELISA a 540nm. Os resultados foram expressos como porcentagem de inibição relativa às células de controle (100%).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

No teste de atividade microbiana do extrato hidroalcoólico de aroeira-mansa os resultados variaram entre 3,12 a 6,25mg/mL para CIM e de 3,12 a 25mg/mL para CFM (Tabela 1), evidenciando atividade antifúngica sobre a *M. pachydermatis*. Não observou-se diferença na suscetibilidade entre os isolados de otite e dermatite.

Tabela 1. Distribuição dos isolados clínicos conforme sensibilidade às concentrações dos extratos, conforme concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Concentração extrato (mg/mL)	CIM		CFM	
	Inativação (n)	Não inativação (n)	Inativação (n)	Não inativação (n)
100,00	48	0	48	0
50,00	48	0	48	0
25,00	48	0	48	0
12,50	48	0	47	1
6,25	48	0	45	3
3,10	47	1	23	25

*n = número de isolados clínicos.

A aroeira é uma planta muito estudada, com relatos de atividade frente a *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* e *Sporothrix schenckii* com extratos de acetato de etila, diclorometano e etanólico de folhas e casca (JOHANN et al., 2007). Porém, ainda são escassos estudos avaliando a sensibilidade da *M. pachydermatis* a extratos vegetais, e ainda não existem trabalhos com o extrato hidroalcoólico de aroeira sobre isolados clínicos de cães para comparar com os presentes resultados.

Com relação à citotoxicidade do extrato, observou-se viabilidade celular superior a 60% a partir da concentração de 50mg/mL (Figura 1).

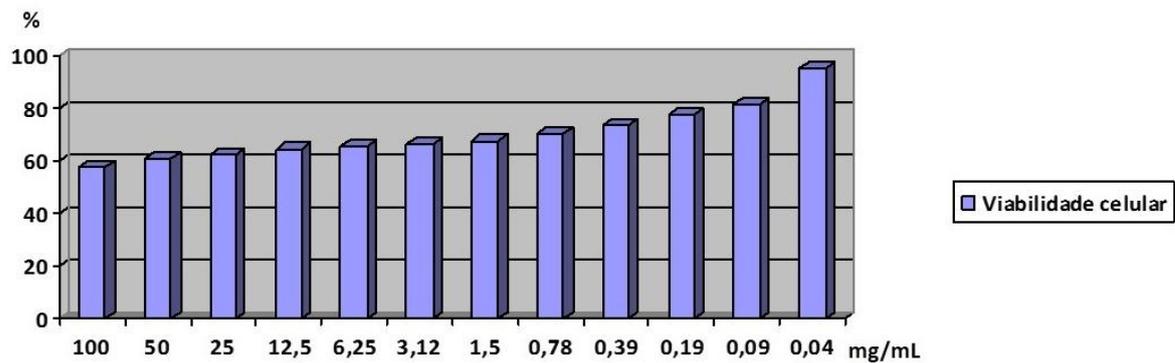


Figura 1. Viabilidade das células (%) pelo teste do MTT frente ao extrato hidroalcoólico de aoreira-mansa (*Schinus terebinthifolius*).

Tais resultados são promissores, pois ao se isolar substâncias, provenientes do metabolismo primário ou secundário das plantas que tenham ação sobre determinados microrganismos, é possível que se diminua o potencial de citotoxicidade, sendo esta uma possibilidade para o extrato estudado. As pesquisas de eficácia e toxicidade são de extrema importância para viabilização de bioativos para uso na indústria farmacêutica (BRASIL, 2004). Porém, estudos de toxicidade com plantas medicinais ainda são pouco realizados, principalmente em nível de ação celular (PERON et al., 2008).

4. CONCLUSÕES

O extrato hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius* apresentou atividade antifúngica frente a *M. pachydermatis in vitro* e apresentaram baixo efeito citotóxico.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGRA M.F.; SILVA, K.N.; BASÍLIO, I.J.L.D.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.18, p.472-508, 2008.

ALVIM, N.A.T.; FERREIRA, M.A.; CABRAL, I.E.; ALMEIDA FILHO, A.J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, Ribeirão Preto, v.14, n.3, p.316-323, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução. RE nº. 90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**. Brasília, 2004.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, approved standard**. CLSI Document M27-A3. 3.ed. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

EICHENBERG, M.L.; APPELT, C.E.; BERG, V. et al. Susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agents evaluated by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v.31, n.2, p.75-80, 2003.

JOHANN, S.; PIZZOLATTI, M.G.; DONNICI, C.L.; RESENDE, M.A. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v.38, p.632-637, 2007.

MACHADO, M.L.S.; APPELT, C.E.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Otites e dermatites por *Malassezia* spp. em cães e gatos. **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v.44, p.27-34, 2003.

MENDES, J.F.; ALBANO, A.P.N.; SANTIN, R.; MEIRELES, M.C.A.; COIMBRA, M.A.A.; LEITE, A.T. M.; MINELLO, L.F.; NASCENTE, P.S. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em gambá-de-orelha-branca (*Didelphis albiventris*). **Revista Clínica Veterinária**, São Paulo, v.16, n.91, p.108-111, 2011.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, Pato Alto, v.65, p.55-63, 1983.

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

PERON, A.P.; FELIPES, J.; MATTGE, G.I.; CANTAGALLI, L.B.; MARIUCCI, R.G.; VICENTINI, V.E.P. Avaliação mutagênica das plantas medicinais *Baccharis trimera* Less. e *Solanum melongena* L. em células de medula óssea de ratos Wistar. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v.6, n.2, p.127-130, 2008.

SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; NACHTIGAL, G.F.; BAUER, M.V.L. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. **Comunicado técnico-EMBRAPA**, Pelotas, n.190, p.1-4, 2008.

SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.