

**SUSCEPTIBILIDADE DE *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* DO CONDUTO
 AUDITIVO DE CÃES AO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO**
**FERNANDA GALLAS BENEDETTI¹; ÂNGELA LEITZKE CABANA²; LUIZA DA
 GAMA OSÓRIO³; CAROLINE ODORISSI CERON⁴; JOÃO RODRIGO GIL DE
 LOS SANTOS⁵; MÁRIO CARLOS ARAÚJO MEIRELES⁶.**

¹ Universidade Federal de Pelotas – *nanda_gallas@yahoo.com.br*

² Universidade Federal de Pelotas - *cabanangela@gmail.com*

³ Universidade Federal de Pelotas – *luizaosorio@yahoo.com*

⁴ Universidade Federal de Pelotas – *carolceron_dot@hotmail.com*

⁵ Universidade Federal de Pelotas – *joao.gil@ufpel.edu.br*

⁶ Universidade Federal de Pelotas – *meireles@ufpel.tche.br*

1. INTRODUÇÃO

A porção externa do ouvido de cães possui microbiota comensal, composta por bactérias e fungos, entre os quais a levedura *Malassezia pachydermatis* (OLIVEIRA, 2006). Em situações de desequilíbrio local (umidade, temperatura, espoliação) e/ou sistêmico (quedas de imunidade devido a fatores estressantes e/ou doenças), podem atuar como patógenos oportunistas, provocando otite externa e em alguns casos dermatite (NOBRE, 1998). A otite externa é muito observada na clínica de pequenos animais, sendo a *Malassezia spp* o micro-organismo isolado com maior frequência no conduto auditivo desses animais (BAPTISTA et al., 2010).

Como alternativa aos compostos mais frequentemente utilizados no tratamento dessa enfermidade, a implementação de plantas como fármacos promissores vem ganhando destaque na medicina humana e veterinária das doenças fúngicas. Tal fato deve-se principalmente à variação nos compostos obtidos nas extrações vegetais, o que dificulta a resistência por parte dos micro-organismos (CLEFF et al., 2010).

Em vista desta realidade, o objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) em diferentes concentrações frente a isolados de *Malassezia pachydermatis* isoladas do conduto auditivo de cães.

2. METODOLOGIA

Realizou-se coletas de material do conduto auditivo de 20 cães, selecionados de forma aleatória, através da técnica de *swab*. As amostras foram cultivadas em Ágar Sabouraud dextrose acrescido de cloranfenicol (Sb+Cl) e em Ágar Sabouraud dextrose, acrescido de cloranfenicol e óleo de oliva (Sb+Cl+Ol). Procedendo-se posteriormente com a análise do crescimento fúngico e caracterização das colônias quanto à macro e microscopia. Das amostras positivas para *M. pachydermatis* foram feitos repiques para a obtenção de culturas puras. O teste *in vitro* de microdiluição em caldo foi realizado em placas de 96 poços em dez níveis de diluição diferentes e em duplicata em 10% amostras coletadas.

Para a técnica foi utilizado 0,1ml de meio de cultura RPMI e aplicado o óleo essencial (antifúngico) diluído em 50% com DMSO, as diluições seguintes foram seriadas em base log₂, e distribuídas no sentido das linhas das microplacas. Da primeira à décima coluna foram distribuídos 0,1mL do inóculo fúngico, preparado com o auxílio de um espectrofotômetro (65% de transmitância e 35% de absorbância da luz incidida sobre elas conforme protocolo). As microplacas foram

então incubadas em estufa “Shaker” (Certomat® BS-1) regulada a uma temperatura de 37°C em constante agitação (40 ciclos/min).

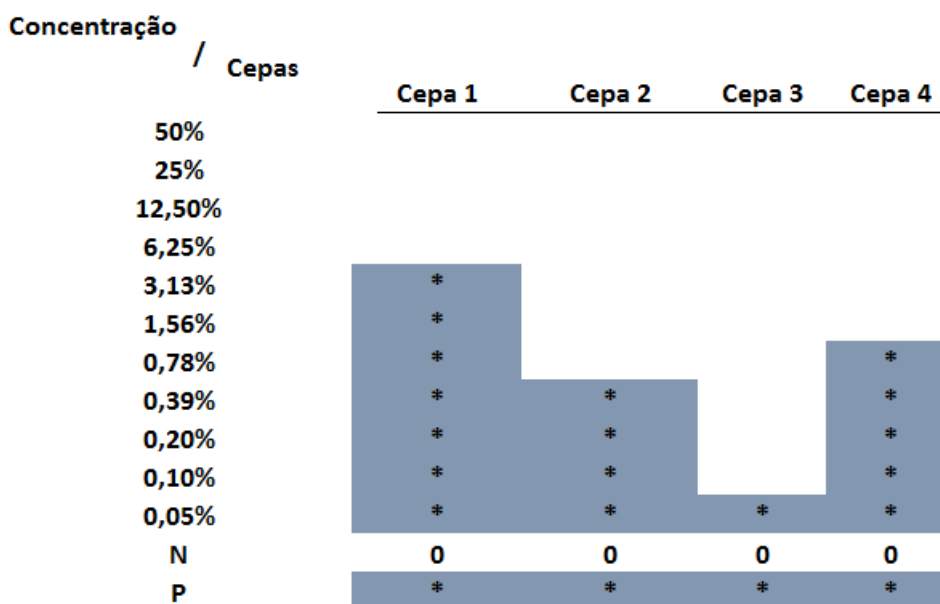
O CIM (concentração inibitória mínima) foi visualizado 48 horas após incubação, sendo considerado o primeiro poço sem crescimento fúngico. Já para o CFM (concentração fungicida mínima) foram cultivadas as diferentes concentrações que não apresentavam crescimento visível a partir do CIM para determinar a concentração da droga capaz de impedir crescimento do fungo no cultivo.

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

Das 40 amostras coletadas, X foram positivas para crescimento de *M. pachydermatis*, apresentando colônias leveduriformes cremosas de coloração creme com crescimento fúngico em duplicata nas placas com e sem adição de lipídio. À microscopia observou-se blastoconídios com estreitamento central, apresentando formato de “pino de boliche”. Conforme descrito por LACAZ (2002).

Nas quatro cepas analisadas, os valores de CIM e CFM do óleo essencial de *O. vulgare* foram distintos, sendo o menor valor encontrado para ambos de 0,098% e o maior valor de 6,25%.

As análises do presente estudo permitiram avaliar a sensibilidade da *M. pachydermatis* quanto ao óleo essencial de orégano, chegando aos resultados de que algumas cepas são sensíveis ao óleo nas concentrações de 25%/12,5%/6,25% definindo assim sua CIM e CFM médias (2,17% e 2,76%, respectivamente), como visualizado na tabela 1.



* Representa crescimento da *malassezia spp* na concentração indicada

N - controle negativo

P - controle positivo

Tabela 1 – Resultados do crescimento de *Malassezia pachydermatis* contra o óleo essencial de orégano

Os resultados obtidos no estudo foram semelhante aos encontrados por CLEFF (2008), onde o óleo essencial de orégano testado apresentou atividade antifúngica frente à *Candida albicans* e *Sporothrix schenckii*. Porém, no estudo o autor encontrou CIM de 0,3%, quase sete vezes menor do que o de 2,7% obtido no presente estudo com *M. pachydermatis*. Também CLEFF et al. (2010) utilizou

o óleo de orégano em microdiluição em caldo frente a *Malassezia* spp., obtendo CIM entre 0,015% à 0,03%, demonstrando, em contraponto com seu estudo anterior, que a sensibilidade do gênero *Malassezia* ao óleo essencial de *O. vulgare* é ainda maior do que dos gêneros *Candida* e *Sporothrix*. A discrepância nos valores de CIM encontrados pelos autores em relação aos resultados obtidos no presente estudo pode estar associado à composição dos óleos utilizados e à patogenicidade das cepas testadas. Já, OLIVEIRA (2004) avaliou *in vivo* o óleo de aroeira à 0,1%, 0,5% e 1% em 20 cães com otite externa e obteve através de cultura e exame direto uma diminuição de 4% no crescimento da *Malassezia* spp. e uma inibição do seu crescimento na concentração de 1% do fitoterápico a base de óleo de aroeira. Diferenciando do presente estudo que teve uma inibição total na concentração de 6,25%.

Portanto apesar de resultados superficiais, pode-se sugerir que o óleo de orégano apresenta um potencial antifúngico frente a *Malassezia pachydermatis*, apesar de serem necessárias mais pesquisas nessa mesma linha.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos através do processo *in vitro* pela técnica de microdiluição em caldo com isolados de *Malassezia pachydermatis*, neste estudo, permitiram concluir que o óleo essencial de orégano possui potencial fungistático e fungicida em diferentes concentrações testadas, no entanto, não houve uma variável fixa para determinar essa sensibilidade apenas com o teste de microdiluição, necessitando de uma maior coleta de dados e estudos complementares posteriores.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAPTISTA, T.C.C.; REIS, C.R.; TEIXEIRA, D.R.; MOURA, M. Diagnóstico de malassezia sp em ouvidos de cães e sua correlação clínica. **Revista Eletrônica Novo Enfoque**, v. 09, n. 09, p. 48 – 55, 2010.
- CLEFF, M. B. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância veterinária com ênfase em *Candida* spp.** 2008. 129p. Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Veterinárias. Porto Alegre.
- 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. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.
- LACAZ C.S., PORTO E., MARTINS J.E.C., HEINZ-VACCARI E.M.; MELO N.T. **Tratado de Micologia Médica Lacaz. Savier**, São Paulo, 2002. 1104p.
- NOBRE, M.; MEIRELES, M.; GASPAR L.F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM R.; SCHUCH L.F.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência rural**, Santa Maria, v. 28, nº 3, p.448, 1998.
- OLIVEIRA L.C; MEDEIROS C.M.O.; SILVA I.N.G.; MONTEIRO A.J.; LEITE C.A.L.; CARVALHO C.B.M. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.3, p.405-408, 2004.
- OLIVEIRA, L.C.; BRILHANTE, R.S.N.; CUNHA, A.M.S, CARVALHO, C.B.M. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.58, n.6, p.1009-1017, 2006.