

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



DISSERTAÇÃO

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIALIDADE ANTI-MALASSEZIA DOS
EXTRATOS DE *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare***

Gabriela Hörnke Alves

Pelotas, 2013

GABRIELA HÖRNKE ALVES

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E POTENCIALIDADE ANTI-*MALASSEZIA* DOS
EXTRATOS DE *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Dr. Rogério Antonio Freitag

Co-Orientadora: Dr^a Marlete Brum Cleff

Pelotas, 2013

Dados de catalogação na fonte:
(Marlene Cravo Castillo – CRB-10/744)

A474c Alves, Gabriela Hörnke

Composição química e potencialidade anti-malassezia dos extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* / Gabriela Hörnke Alves ; orientador Rogério Antonio Freitag; co-orientadora Marlete Brum Cleff. Pelotas, 2013.-89f. : il. - Dissertação (Mestrado) –Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos . Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, 2013.

1.Rosmarinus 2.Origanum 3.HPLC 4.Antifúngico
5.Ensaio in vitro I.Freitag, Rogério Antonio(orientador) II
.Título.

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado intitulada **Composição química e potencialidade anti-*Malassezia* dos extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare***, de autoria de Gabriela Hörnke Alves.

Comissão Examinadora:

Prof. Dr. Rogério Antonio Freitag - Orientador – CCQFA/UFPEL

Prof. Dr Rafael Guerra Lund – Faculdade de Odontologia/UFPEL

Prof. Dr^a Renata Osório de Faria – Faculdade de Veterinária/UFPEL

À mãe por ter me apoiado, pelo amor incondicional e principalmente por ter me concedido a vida.

A minha irmã Magda que sempre esteve comigo me dando apoio e amor de mãe.

Ao meu afilhado e sobrinho Arthur, por ser o bem mais precioso que Deus podia ter enviado as nossas vidas.

Ao meu marido Pedro, amor da minha vida, por todo amor que me concedeu, além de carinho, paz, compreensão, paciência e companheirismo neste período tão importante na minha vida profissional e pessoal. Muito obrigada por tudo, eu te amo muito.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer a Deus por ter concedido a vida, ter me dado força para sempre continuar lutando pelos meus ideais.

Ao professor Rogério Antonio Freitag, meu orientador, por ter me acolhido como aluna de pós-graduação e pela confiança para que eu desempenhasse este trabalho.

À professora Marlete Brum Cleff, minha co-orientadora, por me acolher tão bem e me incentivar muito nos momentos mais difíceis, sempre tentando solucionar os problemas.

À professora Cláudia Cardoso e ao professor Mario Meireles por terem nos concedido os seus laboratórios para que pudessem desenvolver a parte experimental do meu mestrado.

À minha colega e companheira de mestrado Daiane, que podemos ao longo desse período aprender juntas, lutando por nossos mestrados.

A Claúdinha e a Rosema pelo apoio “microbiológico” na parte *in vitro* que desenvolvi na minha dissertação, pois vocês foram indispensáveis para esse trabalho fosse desenvolvido, muito obrigada.

Ao meu marido Pedro, por ter sido tão companheiro, me dando muito amor, carinho, atenção e principalmente compreensão nos momentos de desânimo e muitas lágrimas.

A minha família, minha mãe Olga, minha irmã Magda, meu sobrinho-afilhado Arthur e o meu cunhado Giovane, pessoas sempre estiveram comigo durante essa jornada tão árdua e importante pra mim.

As plantas que através do seu metabolismo secundário foram capazes de sintetizar compostos bioativos e aos animais que também contribuíram muito para o desenvolvimento desse trabalho.

A CAPES, pela bolsa de estudos que me foi concedida para que pudesse realizar esse trabalho de aperfeiçoamento de carreira acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção pela oportunidade de aprimoramento acadêmico e desenvolvimento do projeto de mestrado.

RESUMO

ALVES, Gabriela Hörnke. **Composição química e potencialidade anti-*Malassezia* dos extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare***. 2013. 89f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

A *Malassezia pachydermatis* é uma levedura considerada um patógeno oportunista de extrema relevância em casos de otite canina e em dermatologia veterinária, tornando-se um alvo terapêutico muito importante a ser explorado. As plantas da família Lamiaceae como o *Rosmarinus officinalis* e o *Origanum vulgare*, conhecidos popularmente como “alecrim” e “orégano”, são plantas aromáticas e condimentares que tem demonstrado propriedades medicinais por possuírem substâncias ativas com potencial terapêutico em diversas atividades biológicas, dentre elas, antifúngica, antibacteriana e antiviral. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivos caracterizar os compostos fenólicos de extratos aquosos e etanólicos dessas plantas e avaliar a atividade antifúngica frente à levedura *Malassezia pachydermatis*, isolados clínicos de otite e dermatomicose, através do método de microdiluição em caldo e difusão em disco. O delineamento da composição química dos extratos foi realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e a avaliação da atividade antifúngica foram realizadas conforme os documentos CLSI M27-A3 para microdiluição e a difusão pelo CLSI M44-A2, adaptados para extratos vegetais. De acordo com a análise cromatográfica os ácidos rosmarínico e carnósico, e os flavonóides: luteolina, apigenina, caempferol e quercetina, foram identificados em todos os extratos analisados. Com relação à determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) todos os extratos avaliados apresentaram atividade inibitória e fungicida. O extrato etanólico de orégano foi o que apresentou melhor resultado tendo CIM=7,07mg/mL e CFM=24,34mg/mL. Na avaliação da sensibilidade da levedura frente aos extratos de alecrim e orégano através do método de difusão em disco, os extratos aquosos não apresentaram capacidade de inibição. Com relação aos extratos etanólicos de alecrim e orégano

houve halo de inibição de 6,962 mm e 4,771mm, respectivamente, demonstrando assim diferença significativa entre os extratos frente à levedura testada, no entanto os isolados de pele e orelha não foram diferentes estatisticamente aos extratos testados. Os resultados *in vitro* permitem concluir que os extratos apresentam ação antifúngica, no entanto análises *in vivo* devem ser realizadas para confirmação destes resultados, em busca de alternativas terapêuticas para malasseziose.

Palavras-chaves: *Rosmarinus*, *Origanum*, *Malassezia*, HPLC, antifúngico, ensaios *in vitro*.

ABSTRACT

ALVES, Gabriela Hörnke. **Chemical composition and anti-*Malassezia* potentiality of the *Rosmarinus officinalis* and *Origanum vulgare* extracts**. 2013. 89sh. Thesis (MA) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

Malassezia pachydermatis is a yeast considered an opportunistic pathogen of extreme relevance in cases of canine otitis and in veterinary dermatology, becoming a very important therapeutic target to be explored. The plants of the Lamiaceae family as *Rosmarinus officinalis* and *Origanum vulgare*, known popularly as “rosemary” and “oregano”, are aromatic and condimentar plants that has shown medicinal properties because they possess active substances with therapeutic potential in several biological activities, among them, antifungal, antibacterial and antiviral. Therefore, this study aimed to characterize the phenolic compounds of aqueous and ethanolic extracts of these plants and to evaluate the antifungal activity against the yeast *Malassezia pachydermatis*, clinical isolates of otitis and dermatomycosis, by the method of broth microdilution and disk diffusion. The design of the chemical composition of the extracts was performed by high performance liquid chromatography (HPLC) and the evaluation of antifungal activity was performed according to the documents CLSI M27-A3 for microdilution and CLSI M44-A2 for diffusion, adapted for plant extracts. According to the chromatographic analysis, rosmarinic acid and carnosic, and the flavonoids: luteolin, apigenin, kaempferol and quercetin were identified in all extracts analyzed. In relation to the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) all extracts evaluated showed inhibitory and fungicidal activity. The ethanolic extract of oregano was the one that showed the best result having MIC=7.07mg/mL and MFC=24.34 mg/mL. In the evaluation of the sensitivity of the yeast facing rosemary and oregano extracts by disk diffusion method, the aqueous extracts showed no inhibition capacity. Regarding ethanolic extracts of rosemary and oregano there was a halo of inhibition of 6.962mm and 4.771mm, respectively, thus

demonstrating a significant difference between the extracts against the yeast tested, however the isolates from skin and ear were not statistically different from the extracts tested. *In vitro* results allow us to conclude that the extracts showed antifungal action, however *in vivo* analyses should be performed to confirm these results, in search of therapeutic alternatives for malasseziose.

Keywords: *Rosmarinus*, *Origanum*, *Malassezia*, HPLC, antifungal, *in vitro* assays.

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Flores e folhas de alecrim.....	19
Figura 2. Flores e folhas de orégano.....	20
Figura 3. Ácidos e diterpenos fenólicos encontrados nos extratos de alecrim e orégano	23
Figura 4. Núcleo fundamental dos flavonóides.....	25
Figura 5. Flavonóides encontrados nos extratos de alecrim e orégano.....	26
 ARTIGO 1	
Figure 1 Acids and phenolic diterpenes found in extracts of rosemary and oregano	51
Figure 2 Flavonoids found in the extracts of rosemary and oregano	51
Figure 3 Antifungal Activity (MIC and MFC) of the extracts and antifungal standard against <i>M. pachydermatis</i>	52
 ARTIGO 2	
Figura 1 Principais compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos e etanólicos de alecrim e orégano.....	64
Fig. 2 Cromatogramas correspondentes às análises dos extratos aquosos de alecrim por CLAE-DAD	64
Fig. 3 Cromatogramas correspondentes às análises dos extratos aquosos de orégano por CLAE-DAD	66
Fig. 4 Cromatogramas correspondentes às análises dos extratos etanólicos de alecrim por CLAE-DAD.....	67
Fig. 5 Cromatogramas correspondentes às análises dos extratos etanólicos de orégano por CLAE-DAD	68

Lista de Tabelas

	Página
ARTIGO I	
Table 1. Chemical composition of the extracts analyzed by HPLC-DAD	49
Table 2. Average of the Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicide Concentration for ketoconazole and oregano and rosemary extracts in clinical isolates of <i>M.pachydermatis</i>	50
ARTIGO II	
Tabela 1. Médias dos diâmetros do halo de inibição na análise da difusão em disco com os extratos vegetais de alecrim e orégano em <i>Malassezia pachydermatis</i> isolada de cães	69
Tabela 2. Médias dos diâmetros do halo de inibição na análise da difusão em disco para os extratos etanólicos e aquosos de alecrim e orégano quanto ao local de isolamento da <i>M. pachydermatis</i>	69
Tabela 3. Padrões dos compostos fenólicos com seus respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima intensidade obtidos empregando o método de análise no HPLC-DAD	70

Lista de Abreviaturas

HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i>
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DAD	Detector de arranjo de diodos
MIC	Concentração inibitória mínima, do inglês <i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
MFC	Concentração fungicida mínima, do inglês <i>Minimum Fungicidal Concentration</i>
ANOVA	Análise de variância
DMS	Diferença mínima significativa
CLSI	Instituto de padronização clínico laboratorial, do inglês <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>

SUMÁRIO

	Página
Agradecimentos	vi
Resumo	vii
Abstract	ix
Lista de Figuras	xi
Lista de Tabelas	xii
Lista de Abreviaturas	xiii
Sumário	xiv
1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVOS	17
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
3.1 <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	18
3.2 <i>Origanum vulgare</i> L. (orégano)	19
3.3 Composição química dos extratos de <i>Rosmarinus officinalis</i> e <i>Origanum vulgare</i>	21
3.4 Atividades antimicrobianas do alecrim e orégano	26
3.5 <i>Malassezia pachydermatis</i>	29
4. ARTIGO	32
4.1 Artigo I - Avaliação antifúngica de extratos da família Lamiaceae frente a isolados clínicos de <i>Malassezia pachydermatis</i>	32
4.2 Artigo II – Determinação da composição química e atividade anti- <i>Malassezia</i> dos extratos de alecrim e orégano	53
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
ANEXO 1	87
ANEXO 2	88
ANEXO 3	89

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem uma das mais importantes fontes de substâncias ativas com potencial terapêutico. São frequentemente usadas para tratar uma variedade de doenças e estados patológicos, como na cicatrização de feridas, inflamações, lesões e úlceras, o que pode ser benéfico em muitas populações, principalmente em países como o Brasil que possui um grande número de pessoas que residem em regiões rurais distantes de centros urbanos, tendo assim dificuldade de acesso aos fármacos convencionais (TEMPONE et al., 2008, ALMEIDA et al., 2011). De acordo com dados atuais, tanto na medicina humana como veterinária as plantas podem ser importantes na terapia e profilaxia de doenças (USTULIN et al., 2009; LOPES et al., 2010; MONTES et al., 2012).

A família Lamiaceae compreende uma diversidade de plantas aromáticas, das quais podem ser citadas o alecrim, a manjerona, orégano, sálvia, manjerição e tomilho, que são cultivadas em diversas regiões do mundo, sendo amplamente conhecidas devido às características flavorizantes e organolépticas em alimentos, bem como suas propriedades farmacológicas (KIVILOMPOLO; OBURKA; HYÖTYLÄINEN, 2007; HOSSAIN, 2010a).

O *Rosmarinus officinalis* e o *Origanum vulgare*, conhecidos popularmente como “alecrim” e “orégano”, respectivamente, são cultivados em diversos estados brasileiros, porém são nativos da Europa. Apresentam importância devido à capacidade aromática, bem como suas propriedades medicinais, por exemplo, hepatoprotetora, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênicas, dentre outras (LAMPE, 2003; SRINIVASAN, 2005; HEINRICH et al., 2006).

Devido à resistência e/ou refratariedade estabelecida frente a alguns grupos de fármacos, além dos custos elevados desses tratamentos e efeitos adversos que podem ser gerados por eles, a busca por produtos de origem natural tem se intensificado ocasionando o aumento nas pesquisas com plantas medicinais nas últimas décadas (MARCHIORI, 2004). Além disso, os metabólitos deixados pelos medicamentos alopáticos são de extrema relevância em produtos de origem animal, o que tem sido cada vez mais recriminado pelo mercado consumidor (ANDRADE, 2008). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) 80% da população mundial faz uso de medicamentos derivados de plantas medicinais, pois aproximadamente 25% dos fármacos prescritos mundialmente são provenientes de

plantas. Entre os 252 fármacos básicos ou essenciais selecionados pela OMS aproximadamente 11% são oriundos de fontes exclusivamente vegetais e uma fração preenchida por medicamentos obtidos através de semi-síntese de precursores naturais (RATES, 2001; CORDEIRO et al., 2005). Como exemplo, podem ser citados importantes fármacos extraídos de plantas, dentre eles a digoxina obtida da espécie *Digitalis lanata*; os alcalóides quinina e quinidina obtidas de espécies de *Cinchona* sp.; a vincristina e a vimblastina, obtidas das espécies de *Catharanthus roseus*; através da espécie *Atropa belladonna* são obtidos a atropina e a escopolamina; a morfina e a codeína obtidas de *Papaver somniferum* e o paclitaxel obtido de espécies *Taxus* (RATES, 2001; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

A levedura *Malassezia pachydermatis* acomete cães e gatos, produzindo otite externa e/ou dermatite, sendo a única espécie deste gênero não lipodependente. As leveduras são comensais da superfície da pele e mucosas de diversos animais e, frequentemente atuam como patógeno (GUILLLOT; BOND, 1999; NASCENTE et al., 2010; MELCHERT; JEFERY; GIUFFRIDA, 2011), sendo que fatores como o hospedeiro, falhas nas correções de causas adjacentes, destacando-se as deficiências imunológicas, ocasionam a cronicidade dessa enfermidade. Tanto a malasseziose ótica como cutânea exigem o uso prolongado de antifúngicos tópicos e sistêmicos, o que pode causar resistência dos agentes facilitando a sua multiplicação (SCOTT; MILLER; GRIFFIN, 2001; MACHADO et al., 2010), além disso, diversos estudos comprovam a presença relevante deste microrganismo em patologias otológicas em cães, tornando-se assim um alvo terapêutico a ser explorado (NOBRE et al., 1998; CARFACHIA et al., 2005; BAPTISTA et al., 2010; ALI et al., 2011; MELCHERT; JEFERY; GIUFFRIDA, 2011).

Na medicina veterinária as pesquisas realizadas com plantas medicinais visam à redução e controle de problemas apresentados por vários patógenos que comprometem a produtividade e o bem estar animal, além disso, aspectos econômicos e sociais são muito relevantes para o uso das drogas originárias das plantas (ARAUJO et al., 2009).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Objetivou-se com esse trabalho caracterizar quimicamente os extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* L. através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e avaliar a atividade antifúngica dos extratos aquoso e etanólico frente a isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis*.

2.2 Objetivos Específicos

2.2.1 Identificação dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

2.2.2 Avaliar atividade anti-*Malassezia* dos extratos pelo método de microdiluição em caldo.

2.2.3 Testar a sensibilidade dos isolados de *Malassezia pachydermatis* aos extratos, pelo método de difusão em disco.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Rosmarinus officinalis* (alecrim)

R. officinalis é oriundo da região mediterrânea na Europa, sendo amplamente utilizado na medicina, na culinária, em cosméticos e para magia. O nome em latim, “*Rosmarinus*”, significa “orvalho que vem do mar”, em alusão ao aroma proveniente do alecrim que crescia e desenvolvia-se espontaneamente ao redor das praias mediterrâneas, no entanto, a palavra “*officinalis*” refere-se à planta reconhecida pela prática médico-herborista. Posteriormente, a planta foi associada ao cristianismo, pois existia uma semelhança fonética entre “Maria” e “marinus” fazendo uma correlação com a Virgem Maria, além disso, os nomes populares reforçavam essa hipótese, uma vez que em alemão era chamado “*Mariareinigung*” o que significa “Purificação de Maria”, o que contribui significativamente para a difusão e popularização do uso de *Rosmarinus officinalis* como planta medicinal (HEINRICH et al., 2006).

No Brasil, o alecrim é conhecido popularmente como alecrim-de-jardim, alecrim-rosmarinho, alecrim-de-cheiro, alecrim-comum, alecrim-de-casa, alecrim-de-horta, erva-da-graça, erva-cooada, rosmarino, flor-de-olimpio, rosa-marinha e rosmarinho (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; LORENZI; MATOS, 2008). O estudo classificou-a no reino *Plantae*, divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem Lamiales, família Lamiaceae, gênero *Rosmarinus*, espécie *Rosmarinus officinalis* L. (JOLY, 1987).

O alecrim é uma pequena planta que possui porte subarborescente lenhoso, pouco ramificado, ereto, com altura de aproximadamente 1,5m e folhas lineares, coriáceas e aromáticas, medindo 1,5 a 4 cm de comprimento e espessura de 1 a 3 mm. As flores são pequenas com até 1,5cm de comprimento, hermafroditas, diclamídeas, bilabiadas, possuem coloração azulado-claras com aroma forte e muito agradável, com inflorescências do tipo racemo (LORENZI; MATOS, 2008), conforme mostra a Fig. 1.

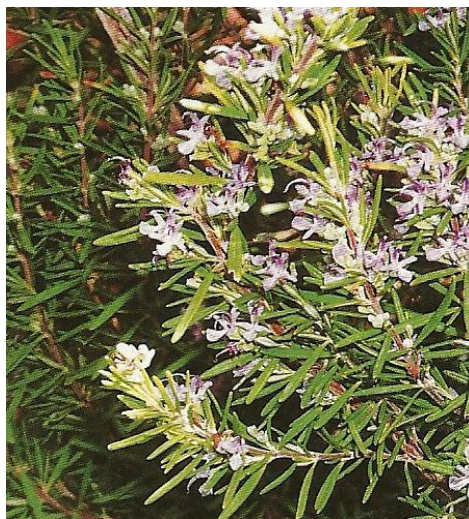


Figura 1 - Flores e folhas de alecrim

Fonte: CUNHA, 2003, p.93.

O alecrim, bem como a maioria das plantas medicinais que foram trazidas na época da colonização, desenvolve-se bem em solos ricos em calcário e em ambientes úmidos de clima ameno, sendo amplamente cultivado em quase todos os países de clima temperado, de Portugal à Austrália (LORENZI, 2008). Essa planta em condições tropicais floresce o ano todo e no Sul do Brasil do final de agosto até o termino do verão, sendo cultivado do nordeste até os Estados do Sul do Brasil (BIASI, 2009).

3.2 *Origanum vulgare* L. (orégano)

Segundo uma lenda grega, Afrodite (deusa do amor) foi a primeira a cultivar orégano, conferindo-lhe um perfume próprio e assim facilitando o reconhecimento dessa planta. No entanto, atualmente sabe-se que o aroma característico do orégano é proveniente de substâncias que compõe o óleo essencial, mais especificamente os fenóis como timol e carvacrol (CASTRO; CHEMALE, 1995; SIMÕES; SPTIZER, 2003).

A maioria das espécies de *Origanum* é nativa da região do Mediterrâneo (Turquia, Grécia e Irã), mas vem sendo cultivado em toda Europa, centro e leste da Ásia e do Taiwan. Nas Américas, local onde essa planta também é encontrada, sua introdução pelo homem foi como tempero, sendo que na América do Sul produtor

desse condimento é o Chile, seguido pela Bolívia e Peru, no Brasil é cultivado no Sul e Sudeste (CASTRO; CHEMALE, 1995; ARCILA-LOZANO et al., 2004; LORENZI; MATOS, 2008).

O gênero *Origanum* pertencente à família Lamiaceae, sendo essa composta por três grupos, 10 secções, 38 espécies e 17 híbridos, caracterizando assim uma diversidade morfológica e química. Existem diferentes nomenclaturas para o orégano, dentre os mais conhecidos o orégano grego (*Origanum vulgare hirtum* L.), orégano espanhol (*Coridothymus capitatus* L.), orégano mexicano (*Lippia graeolens* HBK) e orégano turco (*Origanum onites* L.)(ARCILA-LOZANO et al., 2004).

O *Origanum vulgare* (Figura 2), também conhecido como orégano, é uma planta perene, cuja altura varia entre 25 cm e 40 cm, que apresenta boa adaptação solos calcários e secos, possui um caule ereto com coloração vermelho pardo, piloso, quadrangular, com ramificações nas extremidades superiores, com formação de touceiras, as folhas são verde-escuras ou acinzentadas, pecioladas, inteiras, com pêlos curtos e finos na face interior de cada folha, que medem aproximadamente 1 a 5 cm, as flores possuem variadas cores, dentre elas, rosadas, púrpuras e vermelhas (LORENZI; MATOS, 2008; PRESTES, 2006).

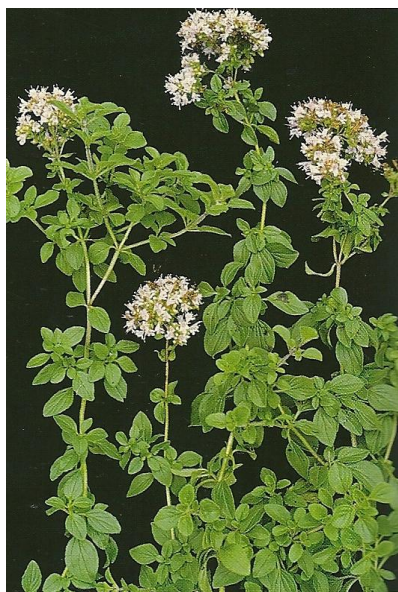


Figura 2 - Flores e folhas de orégano

Fonte: LORENZI, 2008, p.324.

3.3 Composição química dos extratos de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare*

As plantas produzem através do seu metabolismo secundário uma infinidade de compostos aromáticos, sendo a maior parte deles representados por fenóis e seus derivados, os quais têm sido estudados na perspectiva de apresentarem um efeito antimicrobiano (CARVALHO et al., 2003; IGBINOSA; IGBINOSA; AIYEGORO, 2009; CLEFF et al., 2012).

Os compostos fenólicos são sintetizados pelas plantas no desenvolvimento natural e/ou em resposta a condições de estresse biótico e abiótico, ocasionados pela radiação UV, temperatura, por infecção ou fermento causado por organismos patogênicos. Além disso, a variação desses metabólitos depende de uma série de fatores: estágio de desenvolvimento da planta, localização geográfica, período de floração, condições climáticas e época de colheita (HOSSAIN et al., 2010a; LINARES et al., 2011).

As plantas tem a capacidade de produzir substâncias caracterizadas pela presença de um ou mais anéis aromáticos ligados a pelo menos um radical hidroxila e/ou outros substitutos, podendo ser divididos de acordo com o número de anéis fenólicos e com as estruturas nas quais estão ligados. Esses compostos fenólicos incluem os ácidos fenólicos, flavonóides, lignanas, taninos, dentre outros, que são classificados de acordo com o esqueleto básico e os substituintes ligados aos anéis benzênicos (CARVALHO et al., 2003; OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

A família Lamiaceae tem sido alvo de estudo devido ao elevado teor de compostos fenólicos que podem ser extraídos da matriz, prevalecendo o uso das folhas, por solventes orgânicos, os quais possuem polaridade variável o que permite o seu uso com líquidos extratores, dentre os quais podem ser citados: o etanol, metanol, acetona, acetato de etila e hexano, além desses a água é frequentemente utilizada nas extrações, podendo existir combinações entre os solventes (KIVILOMPOLO; HYÖTYLÄINEN, 2009).

As propriedades antioxidantes e antimicrobianas dos extratos de alecrim têm sido atribuídas à composição de uma série de substâncias divididas em três grupos de compostos fenólicos sendo destacados: ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos e flavonóides, composição química que também pode ser encontrada nos extratos de orégano (ALMELA et al., 2006; TÜRE et al., 2008; HOSSAIN et al., 2011).

Os ácidos fenólicos apresentam um grupo funcional carboxila, característico da função ácido carboxílico, podendo ser divididos como: derivados do ácido benzóico e do ácido cinâmico. Os primeiros podem ser representados pelos ácidos vanílico, gálico, siríngico, salicílico, protocatéquico e gentísico. Os ácidos hidroxicinâmicos possuem como exemplo o ácido caféico, p-cumárico, ferúlico e sinápico. Essa classe de compostos fenólicos pode ser encontrada nas paredes celulares e vacúolos da planta (CARVALHO et al., 2003; STALIKAS, 2007; OLIVEIRA; BASTOS, 2011).

O ácido rosmarínico é um composto fenólico derivado do ácido caféico, encontrado principalmente no alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e erva-cidreira (*Melissa officinalis*), podendo estar presente na hortelã, orégano, tomilho e sálvia (PARK et al., 2008; PETERSEN et al., 2009).

O ácido carnósico e o carnosol são diterpenos fenólicos encontrados em cloroplastos, sendo o último produto da degradação oxidativa do primeiro, com uma porção lactona através do anel B e grupos hidroxilo nas posições C-11 e C-12 (JONHSON, 2011; RODRÍDUEZ-ROJO et al., 2012). O ácido carnósico é muito instável principalmente na presença de oxigênio dando origem a outros compostos como carnosol, rosmanol, epirosmanol, dentre outros (THORSEN; HILDEBRANDT, 2003; LINARES et al., 2011; MULINACCI et al., 2011).

Alguns estudos avaliando a composição fenólica dos extratos metanólicos de espécies da família Lamiaceae, dentre elas o alecrim, manjerona, orégano, manjeriço, tomilho e sálvia, demonstraram a presença de compostos (Figura 3) pertencentes à classe dos derivados do ácido hidroxicinâmicos como, por exemplo, o ácido caféico (A), ácido clorogênico (B), ácido p-cumárico (C), ácido rosmarínico (D) e ácido ferúlico (E). Além desses, foram os derivados de ácido benzóico também foram detectados, dentre eles o ácido gálico (F), siríngico (G), vanílico (H), protocatéquico (I) e 4-hidroxibenzóico (J). Os diterpenos fenólicos carnosol (L) e ácido carnósico (M) foram identificados nos extratos metanólicos em todos os extratos e o ácido carnósico foi identificado apenas nos extratos de alecrim, orégano, sálvia e manjerona (SHUN et al., 2005; PROESTOS; KAPSOKEFALOU; KOMAITIS, 2008; HOSSAIN et al., 2010b; HOSSAIN et al., 2011).

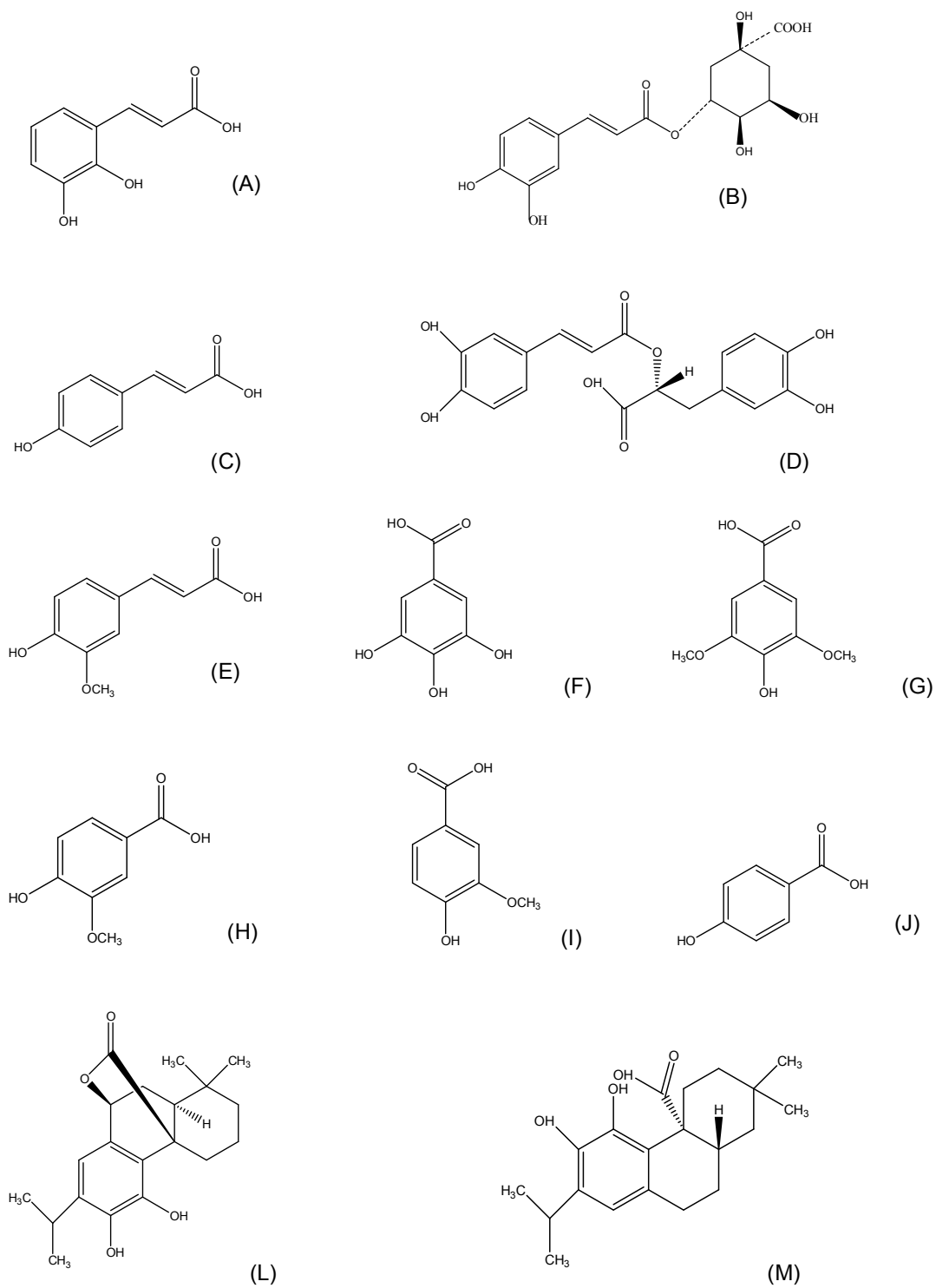


Figura 3 – Ácidos e diterpenos fenólicos encontrados nos extratos de alecrim e orégano

Os extratos aquoso e hidroalcolico de *O.vulgare* e *R. officinalis* foram avaliados quanto aos ácidos fenólicos e o perfil químico, demonstrando a presença dos ácidos clorogênico, caféico, ferúlico, vanílico, siríngico, p-cumárico e ácido rosmarínico, sendo esse o composto majoritário nos extratos etanólicos (SHUN et al., 2005; KIVILOMPOLO; OBURKA; HYÖTYLÄINEN, 2007; HERRERO et al., 2010; DANILA; GATEA; RADU, 2011; RODRÍDUEZ-ROJO et al., 2012).

Quanto aos extratos etanólicos do alecrim e orégano a composição química de ácidos fenólicos foi composta pelos ácidos gálico, clorogênico, vanílico, caféico, siríngico, p-cumárico, ferúlico e rosmarínico, com relação aos diterpenos fenólicos os mais representativos foram ácido carnósico e carnosol (SHUN et al., 2005; KIVILOMPOLO; HYÖTYLÄINEN, 2009; HERRERO et al., 2010; MULINACCI et al., 2011; RODRÍDUEZ-ROJO et al., 2012).

Um estudo foi realizado visando uma comparação quanto à composição do ácido rosmarínico, ácido carnósico e carnosol em extratos com etanol e clorofórmio em alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.), no qual foi demonstrado que os extratos etanólicos de ambos, apresentaram uma elevada concentração de ácido rosmarínico em razão da maior solubilidade em solventes polares e com relação ao ácido carnósico e o carnosol não houve diferenças significativas entre os solventes utilizados. No entanto, extratos de alecrim apresentaram mais carnosol e ácido carnósico em comparação com orégano, e em extratos com clorofórmio o ácido rosmarínico apresentou uma baixa concentração ao contrário do etanólico devido às interações entre a molécula e o solvente extrator (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2009).

Os extratos aquosos e etanólicos foram comparados utilizando métodos de extração diferentes para caracterização de compostos bioativos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sendo detectados os ácidos carnósico, carnosol e rosmadial, rosmanol, e o ácido rosmarínico, composto fenólico característico da família Lamiaceae (LINARES et al., 2011; BAI et al., 2010).

Outro grupo de compostos que perfazem a composição fenólica dos extratos de *R. officinalis* e *O. vulgare* são os flavonóides, compostos fenólicos que possuem diversas formas estruturais, porém a maioria dos representantes apresenta 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental, constituído de duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos entre elas, onde o núcleo fundamental é chamado de benzopirano (Fig. 5), ao qual se encontra ligado um anel aromático, ou seja, 2-

fenil-benzopirano (MATOS; MATOS, 1989; ZUANAZZI, 2002; TSIMIGIANNIS et al., 2007). Os flavonóides são formados pelos produtos das rotas do ácido chiquímico e do ácido malônico e após serem sintetizados esses compostos são transportados para vacúolos ou paredes celulares das plantas (TAIZ; ZEIGER, 2009; JAAKOLA; HOHTOLA, 2010).

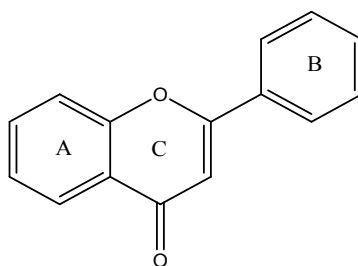


Figura 4 – Núcleo fundamental dos flavonóides

Em extratos metanólicos de plantas da família Lamiaceae, dentre elas alecrim, orégano, manjerona, sálvia, manjeriço e tomilho, foram identificados oito flavonóides: apigenina, luteolina, apigenina-7-O-glucósido, luteolina-7-O-glucósido, galocatequina, quercetina e rutina (HOSSAIN et al., 2010b). As pesquisas prosseguiram e foi constatado que comparando alecrim, manjerona e orégano os flavonóides apigenina-7-O-glucósido e luteolina-7-O-glucósido apresentaram maiores concentrações na manjerona e orégano (HOSSAIN et al., 2011).

Os extratos aquosos e hidroalcolícos de *O. vulgare* foram analisados com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e foram identificados os flavonóides (Figura 5) luteolina (A), quercetina (B), apigenina (C) e caempferol (D) e rutina (E) (KOSAR et al., 2003; DANILA; GATEA; RADU, 2011).

Com relação ao *R. officinalis* pesquisas realizadas por Bai et al. (2010) e Linares et al. (2011) visando a obtenção da composição de flavonóides nos extratos aquoso e etanólico de *Rosmarinus officinalis* delinearam um perfil nas amostras demonstrando presença de apigenina, cirsimarina, caempferol, ladaneína e luteolina.

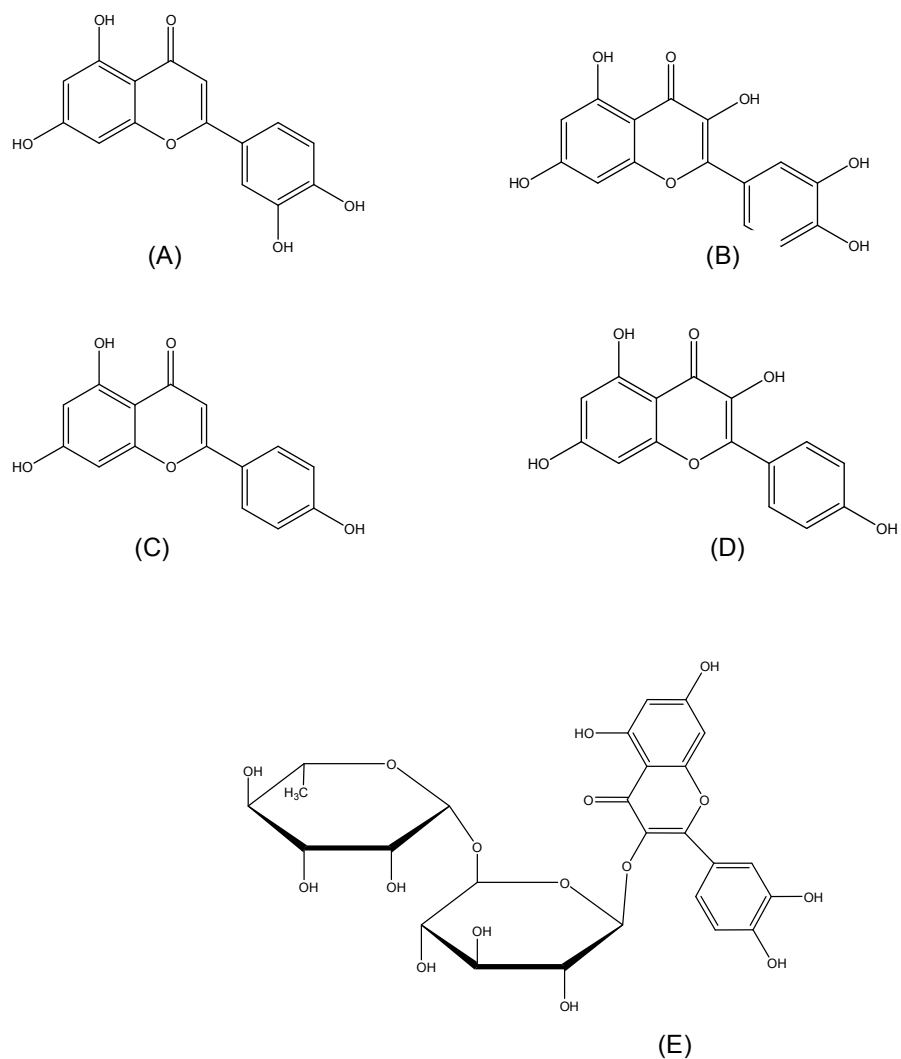


Figura 5 - Flavonóides encontrados nos extratos de alecrim e orégano

3.4 Atividades antimicrobianas do alecrim e orégano

Existem registros por volta de 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung sobre o uso de plantas pela humanidade com finalidades terapêuticas. O botânico grego Pedanios Dioscorides, no ano 78 d.C. descreveu cerca de 600 plantas medicinais no *Tratado De Materia Medica* (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). O uso de plantas medicinais como tratamento alternativo em infecções fúngicas tem se intensificado nas últimas décadas devido ao desenvolvimento de resistência dos microrganismos aos fármacos convencionais, interações

medicamentosas e biodisponibilidade insuficiente do antifúngico no organismo (CAVALEIRO et al., 2006).

Alguns estudos foram realizados visando analisar a potencialidade antimicrobiana dos extratos metanólicos de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) sendo avaliado a ação antifúngica em *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*, demonstrando inibição através dos métodos de difusão em disco e microdiluição em caldo, sendo essa atividade atribuída aos metabólitos secundários presentes no extrato (BRAGA et al., 2007; CEKLITAS et al., 2007). Um estudo semelhante realizado por Höfling et al. (2010) analisou o potencial antifúngico dos extratos com diclorometano e metanol do alecrim frente a *Candida* spp. a fim de determinar a concentração inibitória mínima (CIM), sendo que os extratos testados mostraram-se eficazes na atividade antifúngica contra as linhagens de leveduras testadas. De maneira semelhante os extratos obtidos com etanol, hexano, clorofórmio, e metanol de *R. officinalis* demonstraram atividade antimicrobiana, frente a bactérias Gram-positivas e *Candida albicans* (BOGDADI et al., 2007).

Oskay e Sari (2007) avaliaram os extratos etanólicos de *Rosmarinus officinalis*, frente a bactérias patogênicas e *Candida albicans* através do método de difusão em disco, revelando eficácia antifúngica e contra *Staphylococcus aureus* e outras bactérias resistentes a vários antibióticos. Quando foi avaliado a ação dos extratos metanólicos e óleos essenciais de *R. officinalis* frente a bactérias, dentre elas o *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis*, os resultados indicaram uma maior sensibilidade das bactérias frente aos óleos essenciais do que aos extratos metanólicos (CELIKITAS et al., 2007).

De acordo com o estudo recente realizado por Vegara et al. (2011) foi possível avaliar o sinergismo de uma mistura dos extratos hidroalcolícos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia lavandulifolia* e *Thymus mastichina* que foi testada frente *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que os resultados mostraram que houve algum efeito sobre os microrganismos testados, no entanto, o ácido rosmarínico, composto fenólico majoritário encontrado nos extratos, não foi capaz de inibir as bactérias quando utilizado isolado.

O efeito inibitório de extrato aquoso, metanólico e hidroalcólico de *R. officinalis* foram avaliados frente ao *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus casei*, os quais se mostraram eficazes frente às cepas bacterianas testadas, exceto *Streptococcus mitis*, demonstrando assim que os extratos são promissores agentes antimicrobianos (TSAI; TSAI; HO, 2007; SILVA et al., 2008).

Essawi e Srour (2000) estudaram a atividade de extratos com metanol e diclorometano de *Rosmarinus officinalis* em *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Staphylococcus aureus* sensíveis à meticilina, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis* demonstrando atividade semelhante ou maior do que os extratos aquosos, confirmando uma diferença no perfil químico dos mesmos o que influencia na atividade.

Extratos etanólicos e aquosos de *Origanum vulgare* L. foram avaliados quanto à atividade em *Helicobacter pylori*, sendo constatado que o conteúdo fenólico além de conferir grande potencial antioxidante pode atribuir aos extratos expressiva atividade contra a bactéria testada, pois quanto maior o teor de compostos fenólicos mais eficaz na inibição do crescimento bacteriano (CHUN et al., 2005).

De acordo com Asharaf et al. (2011) a atividade antifúngica dos extratos metanol e clorofórmio de *Origanum vulgare* demonstraram atividade frente a bactérias mais relevante do que o extrato aquoso. Com relação aos fungos filamentosos testados o extrato mais eficaz foi o extrato com clorofórmio, no entanto o extrato metanólico e aquoso também apresentaram atividade.

Com relação à *Malassezia pachydermatis* estudos utilizando os óleos de alecrim e orégano visando avaliar atividade antifúngica tem constatado ótima atividade sendo promissores no tratamento da enfermidade ocasionada por essa levedura (PRESTES, 2008; RUSENOVA; PARVANOV, 2009; CLEFF et al., 2010). Estudos com outros extratos de *Rosmarinus officinalis* são inexistentes enquanto que os extratos de *Origanum vulgare* foram pouco avaliados quanto à atividade nesta levedura, mostrando que a tintura apresenta a atividade de inibição, no entanto a decocção não teve efeito inibitório frente a *M. pachydermatis* (PRESTES et al., 2008).

3.5 *Malassezia pachydermatis*

O gênero *Malassezia* é composto leveduras lipofílicas comensais, anteriormente designadas *Pityrosporum*, que compõe a microbiota cutânea de muitos animais vertebrados, no entanto distúrbios físicos, químicos e imunológicos podem torná-las patogênicas (FAERGEMANN, 2002; CAFARCHIA et al., 2005). A parede celular das leveduras do gênero *Malassezia* é muito fina, envolta por uma camada capsular ou lamelar a qual contém lipídeos, que através de solventes pode ser removida. Além disso, são capazes de produzir gama-lactonas que são os metabólicos responsáveis pelo odor característico desses microrganismos (ASHBEE, 2007).

Essas espécies de leveduras são classificadas quanto à composição e características fisiológicas, bem como a morfologia genômica, sendo assim atualmente encontram-se identificadas 13 espécies, sendo elas: *M. furfur*, *M. sympodialis*, *M. globosa*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. dermatis*, *M. equi*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. caprae* e *M. equina* que são lipodependentes, e a *M. pachydermatis* não-lipodependente (CAFARCHIA et al., 2005; CHEN; HILL, 2005; GALUPPI; TAMPIERI, 2008; ALI et al., 2011).

Em 1925, a espécie *Malassezia pachydermatis* foi identificada, sendo proveniente de escamas de um rinoceronte indiano com dermatite esfoliativa. Essa levedura apresentava-se muito semelhante a *Pityrosporum ovale*, porém de menor tamanho, sendo conferido o nome de *Pityrosporum pachydermatis*. Mais tarde, Gustafson (1955) a isolou de orelhas de cães com otite externa, designando o agente como *Pityrosporum canis* por não possuírem lipodependência da mesma forma que as demais espécies do gênero, então no ano de 1986 foi chamada de *Malassezia pachydermatis* (GUILLOT; BOND, 1999; CHEN; HILL, 2005).

Malassezia pachydermatis é uma levedura que cresce em meio ágar Sabouraud sem a necessidade da presença de ácidos graxos de cadeia longa, e frequentemente pode ser isolada de orelhas de cães que apresentam otites externas, pois é um patógeno oportunista que se desenvolve na superfície da pele e no canal auditivo, podendo ser diagnosticada através de cultivo em meio de cultura, técnicas citológicas e histológicas (CAFARCHIA et al., 2005; NEGRE; BENSIGNOR; GUILLOT, 2008; ASPÍROZ et al., 2010; BAPTISTA, et al., 2010; ALI et al., 2012). Além disso, fatores como acúmulo de gordura, alterações peculiares ao microclima

da pele e ruptura na barreira da epiderme contribuem para a proliferação dessa levedura (NARDONI et al., 2007). Ainda que essas leveduras não possuam atividade queratolítica se desenvolvem sobre a pele ou próximo aos pêlos, utilizando como fontes de energia restos epiteliais ou produtos de excreção, pois enquanto que as espécies lipodependentes estão relacionadas com a pele humana, a *M. pachydermatis* está diretamente vinculada à pele de cães, sendo considerada um importante agente patogênico de otite externa canina (OLIVEIRA et al., 2005; MACHADO et al., 2010).

As colônias formadas por *Malassezia pachydermatis* possuem aspecto cremoso com coloração amarela tornando-se marrom alaranjada com o envelhecimento, opacas e textura friável, granulosas, com células em formato oval pequeno com aproximadamente 1-3µm x 2-4µm, que devido a sucessivos brotamentos apresentam colarinho ou cicatriz, com ausência de hifas ou pseudohifas (VARGAS et al., 2004; NASCENTE, 2006).

Para o crescimento a levedura necessita de uma temperatura que pode variar entre 25° e 41°C, por um período de 24 a 48 horas. Sendo que após uma semana nessas condições *M. pachydermatis* mantém-se viável em temperatura ambiente, porém em baixas temperaturas é muito sensível podendo tornar-se inviáveis (GUILLOT; BOND, 1999; NASCENTE, 2006).

Apesar da multiplicação de *M. pachydermatis* estar associada a fatores de pré-disposição e desequilíbrio das populações de microrganismos, a patogênese das doenças ocasionadas por essa levedura ainda são parcialmente desconhecidas bem como os fatores que afetam a virulência do agente etiológico (BOND et al., 1996; COUTINHO; PAULA, 2000; NEGRE; BENSIGNOR; GUILLOT, 2008)

As otites externas associadas a *M. pachydermatis* são caracterizadas por um exsudato de cerúmen marrom ou amareladas, com graus variados de eritema, prurido e dor (GUILLOT; BOND, 1999; NOBRE et al., 2001; NARDONI et al., 2005), são geralmente causadas por associações com *Staphylococcus intermedius*, sendo assim caracterizada como polimicrobiana, pois esses microrganismos utilizam os produtos metabólitos em comutação ocorrendo assim uma relação simbiótica entre eles (ROSALES et al., 2005; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007; OLIVEIRA et al., 2008).

De acordo com estudos essa levedura tem sido encontrada mais frequentemente em cães com otite quando comparado com ouvidos sadios,

comprovando assim o fator patogênico desse microrganismo, que se prolifera em condições de grande secreção de cerúmen, no meato acústico externo, e mantendo assim a resposta inflamatória (CRESPO; ABARCA; CABAÑES, 2002; ANGUS, 2004; GIRÃO et al., 2006; NASCENTE, 2006; LYSKOVA; VYDRZALOVA; MAZUROVA, 2007). Outro fator relevante é que em otite externa crônica a prevalência de *M. pachydermatis* é maior do que na forma aguda, bem como que os isolamentos clínicos de amostras da levedura são mais incidentes em casos crônicos do que agudos (WALLMANN; MARX, 1990; SMITH, 1968).

A levedura *M. pachydermatis*, em termos de virulência e sobrevivência, possui a capacidade de se aderir firmemente aos queratinócitos, alterando a coesão entre as células, além de poder danificar a queratina e a produção de enzimas que alterando a composição do manto lipídico cutâneo, e assim promover uma inflamação no local, bem como desencadear processos inflamatórios que facilitariam a penetração da levedura nos tecido (GABAL, 1988; BOND, 1997).

Com relação ao tratamento da malasseziose, têm sido utilizado nistatina e pimaricina, além dos azóis, como cetoconazol, tiabendazol, miconazol e cotrimazol (NASCENTE, 2006). No entanto, nos casos mais graves ou sistêmicos, os principais antifúngicos utilizados são o cetoconazol e o itraconazol que inibem a biossíntese do ergosterol, tendo como consequência alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, inibindo o seu crescimento (CHEN; HILL, 2005; SANTOS; MARTINS, 2008).

No entanto, os antifúngicos existentes não são totalmente eficazes, para atender a demanda da área de micologia veterinária, pois além de envolver um longo tempo de administração, toxicidade e alto custo, os microrganismos já são capazes de desenvolver mecanismos de resistência a essas drogas (NASCENTE, 2006; CLEFF et al., 2010). Além disso, o cetoconazol, principal fármaco utilizado em cães em todo o mundo, pode causar efeitos adversos importantes, como reprodutivos, toxicidade hepática e renal (GUILLLOT; BOND, 2003), sendo assim esses fatores impulsionam a descoberta de novos fármacos a partir de fontes naturais que poderão ser utilizadas como tratamento de forma isolada ou sistemática com fármacos convencionais.

4 ARTIGOS

4.1 Artigo I

Composição química e atividade antifúngica de extratos da família Lamiaceae frente a isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis*

Gabriela Hörnke Alves ¹, Daiane Einhardt Blank ¹, Roger Vasques Marques ²,
Cláudia Giordani ³, Marlete Brum Cleff ³, Rogério Antonio Freitag ¹

Artigo formatado conforme as normas da revista **Planta Medica**

Status: submetido (conforme ANEXO 3)

Chemical composition and antifungal activity of extracts from the Lamiaceae family facing clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*

Gabriela Hörnke Alves ¹, Daiane Einhardt Blank ¹, Roger Vasques Marques ², Cláudia Giordani ³,
Marlete Brum Cleff ³, Rogério Antonio Freitag ¹

Affiliation

¹ Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil

² Department of Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

³ Faculty of Veterinary, Federal University of Pelotas, Pelotas, Brazil.

Correspondence

Prof. Dr. Rogério Antônio Freitag, Center for Chemical, Pharmaceutical and Food Sciences, Federal University of Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão, s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900, Pelotas, RS, Brazil. E-mail: <rafreitag@gmail.com>. Phone: +55 (53) 3275 7358 Fax + 55 53 3275 7354

Abstract

This study evaluated the chemical profile of the aqueous and ethanol extracts of rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and oregano (*Origanum vulgare*) and also was evaluated the antifungal activity of the extracts in 37 clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* by microdilution testing (CLSI M27-A3). The aqueous and ethanolic extracts were prepared with ethanol and water, separately, and the chemical identification of phenolic compounds was performed by high performance liquid chromatography (HPLC). The chemical composition analysis showed the presence of rosmarinic acid, carnosic acid, luteolin, apigenina, kaempferol and quercetin in all the extracts analyzed. Regarding anti-*Malassezia* activity of the extracts the results were expressed as minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC). The ethanolic extract of oregano showed MIC=7.07 mg/mL and MFC=24.34 mg/mL and the rosemary aqueous extract, MIC=28.29 mg/mL and MFC=58.55 mg/mL, being statistically different, although both showed similar chemical composition as to the presence of acids, phenolic diterpenes and flavonoids; however, when compared, caffeic acid was identified only in the extract of *O. vulgare*. The MIC's for the aqueous extract of oregano and ethanolic of rosemary were 44.08mg/mL and 70.39mg/mL, respectively, however there was no statistical difference when compared. Therefore, the extracts of *R. officinalis* and *O. vulgare* can be considered source of bioactive compounds that should be studied to better contribute to the development of a treatment for malassezioses.

Keywords

Rosmarinus, *Origanum*. Lamiaceae, HPLC, microdilution, *Malassezia*.

Introduction

Mycoses are among the most commonly diagnosed skin problems in small animal clinics, which are usually caused by dermatophytes of the genera *Microsporum* and *Trichophyton* and by the *Malassezia pachydermatis* and *Candida albicans* [1] yeasts. The *M. pachydermatis* has been found in cutaneous tegument and ear canal of dogs, is often related to cases of recurrent otitis or complicated, when compared with healthy ears, thus proving the pathogenic potential of this microorganism that proliferates in conditions of great amount of cerumen in the external acoustic meatus of dogs, thus maintaining the inflammatory response [1-5].

Regarding the treatment of this yeast infection, it has been used nystatin and pimaricin besides the azoles as thiabendazole, miconazole and cotrimazol topically. Otherwise, ketoconazole and itraconazole, that are drugs widely used in veterinary clinic, are recommended for both external and systemic use [6-9]. However, yeast infections require prolonged use of antimicrobials and can cause resistance to topical and systemic antifungal drugs, thus becoming a therapeutic target to be explored [10-12]. Regarding the use of vegetable extracts of oregano and rosemary there are only reports about essential oils that can be considered a source of active principles for treatment of malasseziosis [13-15], however with respect to the extracts there are few reports of its use against *Malassezia pachydermatis* [16].

Therefore, considering the exposed, aimed with this work to chemically characterize the extracts of *Rosmarinus officinalis* and *Origanum vulgare* by high performance liquid chromatography and to evaluate the antifungal activity of aqueous and ethanolic extracts on clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*.

Results and discussion

Chromatography analyses of extracts

The analysis by HPLC-DAD was performed to define the profile of the main phenolic compounds present in the aqueous extracts and ethanolic extracts of rosemary and oregano, and the results are shown in **Table 1**. Regarding phenolic acids (**Fig. 1**) it was identified the presence of caffeic acid only in ethanolic extracts of rosemary and oregano, and p-coumaric acid as component of the aqueous extract of rosemary, aqueous extract of oregano and ethanolic extract of oregano. Some similar results were found in the literature on analyzes of aqueous, ethanolic and hydroalcoholic extracts of the same plants used in this study [17-21]. According to the results, it can be seen that rosmarinic acid (**Fig. 1**) is the component found in all extracts, being considered the main component of the phenolic fraction of the Lamiaceae family, and can be found in aqueous, hydroalcoholic and methanolic extracts, as is mentioned in the literature [20-23].

The phenolic diterpenes (**Fig. 1**) carnosol and carnosic acid have also been identified in the samples, being characteristic the presence in the extracts of rosemary and oregano, but carnosol was not identified in the aqueous extract of oregano [22-25]. The carnosic acid was identified in all extracts, however this compound is very unstable especially in the presence of oxygen and can originate other compounds such as carnosol, rosmanol, epirosmanol, epiisrosmanol, among others [22, 25, 26].

Another group of phenolic compounds found in extracts of the Lamiaceae family are the flavonoids (**Fig. 2**), and were also identified by liquid chromatography luteolin, apigenin, kaempferol and quercetin in all aqueous and ethanolic extracts analyzed in this study. However, the glycosylated flavonoid rutin was not identified in any of the extracts analyzed. The compound has excelled in terms of its various pharmacological activities, among them anti-*Candida* and anti-inflammatory [27, 28].

Other studies performed with the aqueous and hydroalcoholic extracts of *O. vulgare* confirm a chemical profile similar to the extracts analyzed in this study because were also identified the flavonoids luteolin, quercetin, apigenin and kaempferol [20, 29]. With respect to *R. officinalis* researches performed (BAI *et al.*, 2010; LINARES *et al.*, 2011) in order to obtain the composition of

flavonoids found the presence of apigenin, kaempferol, luteolin, as well as ladanein and cirsimaritin in aqueous and ethanolic extracts of *Rosmarinus officinalis* and also outlined a profile similar to the samples evaluated in this study [22, 23].

It has been described that the difference in the composition of the extracts, besides being related to the solvent extractor and the technique used, is greatly influenced by a number of factors, because the plants synthesize these phenolic compounds during their natural development and/or in response to stress biotic and abiotic stress conditions, such as ultraviolet (UV) radiation, temperature or infection or injury caused by pathogenic organisms, as well as its variation depends on factors such as plant development stage, geographic location, time of flowering, weather conditions and time of harvesting [22, 30].

According to studies performed, the antioxidant and antimicrobial properties of rosemary extracts has been assigned to the groups of phenolic compounds being highlighted: phenolic acids, phenolic diterpenes and flavonoids, chemical composition that can also be found in the extracts of oregano. Some of these compounds were identified in extracts used in our study [31-33].

Antifungal activity

The sensitivity of clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* facing the standard antifungal (ketoconazole) and the extracts of rosemary and oregano was evaluated using the microdilution test and results showed statistical differences ($p < 0.05$) (**Table 2**).

According to the results presented in Table 2, analyzing the minimum inhibitory concentration of aqueous extracts of rosemary and orégano, it was found that there is significant difference between treatments, so that the aqueous extract of rosemary inhibited the isolates with concentration (MIC=28.29mg/mL) lower than that of the aqueous extract of oregano (MIC=46.71mg/mL). Maybe it can be explained by the difference of composition of the extracts being the latter free from carnosol, however this hypothesis can only be confirmed with tests of the compounds individually or in groups.

Similarly behaves the aqueous extract of oregano which requires a higher concentration for fungicidal activity.

Regarding ethanolic extracts it was observed that the ethanolic extract of rosemary requires a higher concentration for the inhibitory action against the tested yeast, which does not occur with the extract of oregano, because the inhibitory concentration is lower. The presence of p-coumaric acid in the ethanolic extract of oregano may be related to the MIC (7.07mg/mL) and MFC (24.34mg/mL) in the isolates, because in the ethanolic extract of rosemary where there was no compound found the results were MIC=44.08mg/mL and MFC=70.39mg/mL. According to some authors the p-coumaric acid, its derivatives and flavonoids present in propolis extract have activity against *M. pachydermatis* requiring an extract concentration of 2.6mg/mL to inhibit 50% of the isolates [34, 35].

In literature there are no reports of evaluation of aqueous and ethanolic extracts of rosemary against the yeast *Malassezia pachydermatis*. With respect to extracts of oregano a study was conducted with oil, tincture and decoction of *O. vulgare* and the results show that the essential oil requires a lower concentration (5%) to inhibit the yeast, the tincture inhibits in a concentration of 25% and the decoction showed no activity [16]. Another study conducted on clinical isolates of this yeast, tested against the oregano oil, obtained minimum inhibitory concentration of 15 to 30µL/mL, however it should be considered that the chemical profile of the essential oil consists of 4-terpineol, α -terpineol, 4-terpinene, thymol and carvacrol, which are volatile compounds, being very different from the composition of the extracts, but that anyway already demonstrated the antimicrobial potential of *O. vulgare* [14]. The *M. pachydermatis* in another study was evaluated against the oils of rosemary and oregano, which showed antimycotic activity, having MIC and MFC 0.8% for *O. vulgare* and 1.3% for *R. officinalis* [15].

Subsequently, to evaluate the possibility of differential sensitivity of the isolated yeasts of the skin and ear canal of dogs, it can be seen that the F value calculated (1.32) was lower than the F tabulated (1.41; GL = 37; GLr = 148), demonstrating that the isolates showed no significant difference between themselves regarding their resistance to the extracts tested (p=0.05).

When comparing the different extracts on the sensitivity of the isolates (MIC and MFC) and the controls, we found that the positive control group (standard antifungal) was the most effective in the inhibition of the yeasts, followed by the ethanolic extract of oregano and aqueous extract of rosemary. It was possible to observe that F calculated (145.52) was higher than the F tabulated (2.10; GL=4; GLr=148), having significant difference between extracts at 5% level of significance. However, it is not possible to make a comparison of the results, due to the difference in composition, since ketoconazole is an azole which inhibits the biosynthesis of ergosterol, very different from the phenolic compounds of the extracts which have mechanisms of action still unknown.

Therefore, in a general way when observing the antifungal activity of the extracts in Figure 3, it can be concluded that the inhibitory potential against *M. pachydermatis* of the ethanolic extract of oregano is great and it can inhibit 92% and has fungicide action 75.55%, thus being very close to the standard drug tested, ketoconazole, with MIC 99.96% and MFC 99.94% of this yeast. The aqueous (71.71%) and ethanolic (55.92%) extract of rosemary, as well as the aqueous extract of oregano (53.29%) have a fungistatic potential and a capacity of inhibition of 41.45%, 29.61% and 11.84%, respectively, in accordance with the statistical data shown before.

The substances present in their chemical composition, among them phenolic acids, phenolic diterpenes and flavonoids, are sources of bioactive compounds in the treatment of malasseziosis, mainly the ethanol extract of oregano and rosemary aqueous. However studies with isolated compounds and *in vivo* should be performed looking for a better bioprospection of the use of these plants of the Lamiaceae family with alternative treatment.

Materials and methods

Plant material

Were used dried leaves of *Rosmarinus officinalis* and *Origanum vulgare* commercially acquired from the company Luar Sul Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios (Santa Cruz do Sul/RS/Brazil), with lot number 001/2011 product specification certificate.

Preparation of the extracts

For obtaining brute aqueous extract from both plants, were used 25g of dried leaves and 250mL of distilled water, while for obtaining the ethanolic extracts were used 35g of dried leaves and 350mL of ethyl alcohol (Synth). The plant samples were placed in round-bottomed flask of 500mL and kept under constant stirring on a heating plate with an oil bath until a temperature of 65° to 70° C. The ethanolic extracts were maintained under these conditions for 24 hours, after that time passed it was filtered and the aqueous extract was maintained for one hour, and then filtered. The procedure was repeated twice. Ethyl alcohol was evaporated in rota evaporator until obtaining the dry extract.

The brute aqueous extracts were stored in metal trays and frozen at -70°C to be lyophilized for 48 hours. The lyophilized sample was stored in small flasks, hermetically closed, for subsequent use in chromatographic analyzes and *in vitro* tests.

HPLC analysis of the extracts

Analyses were performed using the technique of high performance liquid chromatography with diode-array detector (HPLC-DAD) using the equipment from Varian® (UEMS, Dourados, Brazil) and a reversed phase Phenomenex Gemini column C-18 (25cm x 4.6mm x 5µm) for chromatographic separation with a binary mobile phase of water with 6% of acetic acid and 2mM of sodium acetate (eluent A) and acetonitrile (eluent B). In order to achieve the separation of the compounds of the

extracts of rosemary and oregano the flow rate used was 1 mL min^{-1} and the injection volume of $10\mu\text{L}$. The following linear gradient was used: 0min, 5% of B; 45min, 15% of B; 55min, 30% of B; 60min, 50% of B; 65min, 100% of B, and, finally, at 75min, 5% of B. The separated compounds were monitored with DAD and the spectra of the peaks were recorded at 240 nm and 325 nm.

The patterns used were purchased from Sigma Aldrich® containing high levels of purity (%), being and solubilized in methanol, among them the vanillic acid (97%), caffeic acid (98%), vanillin (99%), p-coumaric acid (98%), ferulic acid (99%), sinapic acid (98%), rosmarinic acid (98%), carnosol (98%), carnosic acid (97%), quercetin (98%), luteolin (98%), rutin (94%), kaempferol (90%) and apigenin (95%).

Malassezia isolates

Clinical isolates of *Malassezia pachydermatis* were collected from the ear conduct (n=30) and cutaneous tegument (n=7) of dogs and identified in the Mycology Laboratory of the Veterinary School of the Federal University of Pelotas, totaling 37 samples.

In vitro susceptibility testing

The susceptibility of *M. pachydermatis* strains to antifungal compounds was verified using the reference CLSI M27-A3 (Clinical and Laboratory Standards Institute) with some modifications. From the stock solutions of the rosemary (200mg/mL) and oregano (100mg/mL) extracts and the ethanolic extracts in 5% of dimethylsulfoxide (DMSO), seriated dilutions were made in Sabouraud medium sequentially in the microplates, filling the wells belonging to the columns numbered from 2 to 10, being the test made in duplicate.

The solution of inoculum of *M. pachydermatis*, previously adjusted in 0.5 McFarland scale and wavelength of 530nm, was distributed in a volume of $100\mu\text{L}$ in the microplate, and positive control

(inoculum-culture medium), negative control (extract-medium) and control 5% of dimethyl sulfoxide (DMSO) columns were used, then the plates were incubated at 37°C in an oven up to 72 hours.

The reading of the test was performed by visual comparison (turbidity) of yeast growth that occurred in the wells concerning the various concentrations tested (lanes 2-10) with their growth in the positive-control well. The lowest concentration capable of producing prominent inhibition (about 50%) of yeast growth compared to the positive-control well was identified as the MIC (Minimum Inhibitory Concentration) of the extract for this yeast. To determine the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were used aliquots of 10µL of the wells without growth and of the MIC in Petri plates on Sabouraud agar which were incubated at 37°C for 48 hours.

Statistical analysis

The experimental data obtained were tabulated followed by analysis of variance (ANOVA). The least significant difference (LSD) between the averages of the results were analyzed by Tukey test at 5% level of significance [36].

Conflict of Interest

There were no conflicts of interest among all authors in this manuscript

References

- ¹ Machado MLS, Appel CE, Ferreiro L. Dermatophytes and yeasts isolated from the skin of dogs with various skin diseases. *Acta Sci. Vet.*, 2004; 32:225-232.
- ² Crespo MJ, Abarca ML, Cabañes FJ. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with or without otitis externa. *Med Mycol*, 2002;40:115-121.
- ³ Angus JC. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin N AM-Small*, 2004; 34:411-424.
- ⁴ Girão MD, Prado MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA, Monteiro AJ, Sidrim JJC, Rocha MFG. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: A comparative analysis. *Vet J*, 2006; 172:544-548.
- ⁵ Lyskova P, Vydrzalova M, Mazurova J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. *J Vet Med*, 2007; 54:559-563.
- ⁶ Chen T, Hill PB. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. *Vet Dermatol*, 2005; 16:4-26.
- ⁷ Oliveira LC, Medeiros CMO, Silva ING, Monteiro AJ, Leite CAL, Carvalho CBM. Susceptibility to antimicrobial of bacteria isolated of otitis externa in dogs. *Braz Arch Vet Med Anim Sci*, 2005; 57:405-408.
- ⁸ Nascente PS, Meinerz ARM, Faria RO, Schuch LFD, Meireles MCA, Mello JRB. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. *Braz J Microbiol*, 2009; 40:222-226.
- ⁹ Machado MLS, Ferreiro L, Ferreira RR, Corbellini LG, Deville M, Berthelemy M, Guillot J. *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. *Vet Dermatol*, 2010; 22:46-52.

- ¹⁰ Cafarchia C, Gallo S, Romito D, Capelli G, Chermette R, Guillot J, Otranto D. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *J Vet Diagn Invest*, 2005; 17:316–322.
- ¹¹ Ali H, Shahram J, Mansour B, Ali SA, Parviz M, Siamak MR. Identification of Different *Malassezia* Species Isolated from Skin of Healthy Dog Owners in Tabriz, Iran (2010-2011). *Adv. Environ. Microbiol*, 2011; 5:3688-3693.
- ¹² Melchert A, Jefery ABS, Giuffrida R. Cytological evaluations in canine otitis by *Malassezia* spp.: retrospective study. *Colloquium Agrariae*, 2011; 7:27-34.
- ¹³ Rusenova N, Parvanov P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. *Trakia J Sci*, 2009; 7:37-43.
- ¹⁴ Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente P S, Rodrigues MR, Meireles MCA. Inhibitory activity of the essential oil of oregano in fungi of medical and veterinary importance. *Braz Arch Vet Med Anim Sci*, 2010; 62:1291-1294.
- ¹⁵ Pistelli L, Mancianti F, Bertoli A, Cioni PL, Leonardi M, Pisseri F, Mugnaini L, Nardoni L. Antimycotic Activity of Some Aromatic Plants Essential Oils Against Canine Isolates of *Malassezia pachydermatis*: An in vitro Assay. *Open Mycol J*, 2012; 6:17-21.
- ¹⁶ Prestes LS, Frascolla R, Santin R, Santos MAZ, Schram RC, Rodrigues, MRA, Schuch LF., Meireles MCA. Extracts from oregano and thyme against external otitis-associated microorganisms. Available at: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962008000400003&lng=es&nrm=iso. Accessed February 13, 2013.
- ¹⁷ Chun S, Vatter CDA, Lin Y, Shetty K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Proc Biochem*, 2005; 40:809–816.

- ¹⁸ Kivilompolo M, Oburka V, Hyötyläinen T. Comparison of GC–MS and LC–MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. *Anal Bioanal Chem*, 2007; 388:881–887.
- ¹⁹ Herrero M, Plaza M, Cifuentes SA, Ibáñez E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J Chromatogr A*, 2010; 1217:2512–2520.
- ²⁰ Danila AO, Gatea F, Radu GL. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. *Chem Nat Compd*, 2011; 47:22-26.
- ²¹ Rodríguez-Rojas S, Visentin A, Maestri D, Cocero MJ. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J Food Eng*, 2012; 109:98–103.
- ²² Linares IB, Arráez-Román D, Herrero M, Ibáñez E, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2011; 1218:7682–7690.
- ²³ Bai N, He K, Roller M, Lai C, Shao X, Pan M, Ho C. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J Agric Food Chem*, 2010; 58:5363–5367.
- ²⁴ Proestos C, Kapsokefalou M, Komaitis M. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC- MS after silylation. *J Food Quality*, 2008; 31:402–414.
- ²⁵ Mulinacci N, Innocenti M, Bellumori M, Giaccherini C, Martini V, Michelozzi, M. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. *Talanta*, 2011; 85:167–176.
- ²⁶ Thorsen MA, Hildebrandt KS. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification. *J Chromatogr A*, 2003; 995: 119–125.

- ²⁷ Guardia T, Rotelli AE, Juarez AQ, Pelzer LE. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effect of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. *II Pharmacology*, 2001; 56: 683-687.
- ²⁸ Han Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *Int Immunopharmacol*, 2009; 9:207-211.
- ²⁹ Kosar M, Dorman HJD, Bachmayer O, Baser KHC, Hiltunen R. An improved on-line HPLC-DPPH* method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of lamiaceae plants. *Chem Nat Compd*, 2003; 39:161-166.
- ³⁰ Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. *Food Chem*, 2010; 123:85–91.
- ³¹ Almela L, Sánchez-Munoz B, Fernández-López JA, Roca MJ, Rabe V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J Chromatogr A*, 2006; 1120:221-229.
- ³² Türe H, Eroglu E, Soyer F, Özen B. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. *Int J Food Sci Tech*, 2008; 43:2026–2032.
- ³³ Hossain MB, Barry-Ryan C, Martin-Diana AB, Brunton NP. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem*, 2011; 126:339–346.
- ³⁴ Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim PJN. Propolis: updates on chemistry and pharmacology. *Braz J. Pharmacogn*, 2008; 18:447-454.
- ³⁵ Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves, SH, Vargas AC. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet Microbiol*, 2010; 142:432–434.

³⁶ *Montgomery DC, Runger GC. Applied Statistics and Probability for Engineers, 5th Ed, Rio de Janeiro: LTC; 2012.*

Legends for Figures

Figure 1 Acids and phenolic diterpenes found in extracts of rosemary and oregano

Figure 2 Flavonoids found in the extracts of rosemary and oregano

Figure 3 Antifungal Activity (MIC and MFC) of the extracts and antifungal standard against *M. pachydermatis*

Table 1 Chemical composition of the extracts analyzed by HPLC-DAD

Substance	Retention time (min)	AER	EER	AEO	EEO
vanillic acid	13.95	-	-	-	-
caffeic acid	14.86	-	X	-	X
syringic acid	16.32	-	-	-	-
vanillin	19.44	-	-	-	-
p-coumaric acid	25.48	X	-	X	X
ferulic acid	31.28	-	-	-	-
sinapic acid	33.96	-	-	-	-
rutin	45.7	-	-	-	-
rosmarinic acid	53.92	X	X	X	X
quercetin	60.33	X	X	X	X
luteolin	60.68	X	X	X	X
carnosol	67.01	X	X	-	X
carnosic acid	67.31	X	X	X	X
kaempferol	68.08	X	X	X	X
apigenin	69.12	X	X	X	X

Caption: ERA - Aqueous Extract of Rosemary; EER - Ethanolic Extract of Rosemary; AEO - Aqueous Extract of Oregano; EEO - Ethanolic Extract of Oregano.

Table 2 Average of the Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Fungicide Concentration for ketoconazole and oregano and rosemary extracts in clinical isolates of *M.pachydermatis*

Samples	Averages (mg/mL)	
	MIC	MFC
Ketoconazole *	0.040 ^a	0.058 ^a
EEO	7.07 ^b	24.34 ^b
ERA	28.29 ^c	58.55 ^c
EER	44.08 ^d	70.39 ^d
AEO	46.71 ^d	88.16 ^c

Caption: ERA - Aqueous Extract of Rosemary; EER - Ethanolic Extract of Rosemary; AEO - Aqueous Extract of Oregano; EEO - Ethanolic Extract of Oregano

* Standard antifungal (Ketoconazole)

a, b, c, d - same letters in the columns do not differ significantly among themselves, different letters in the columns differ significantly among themselves ($p < 0.05$).

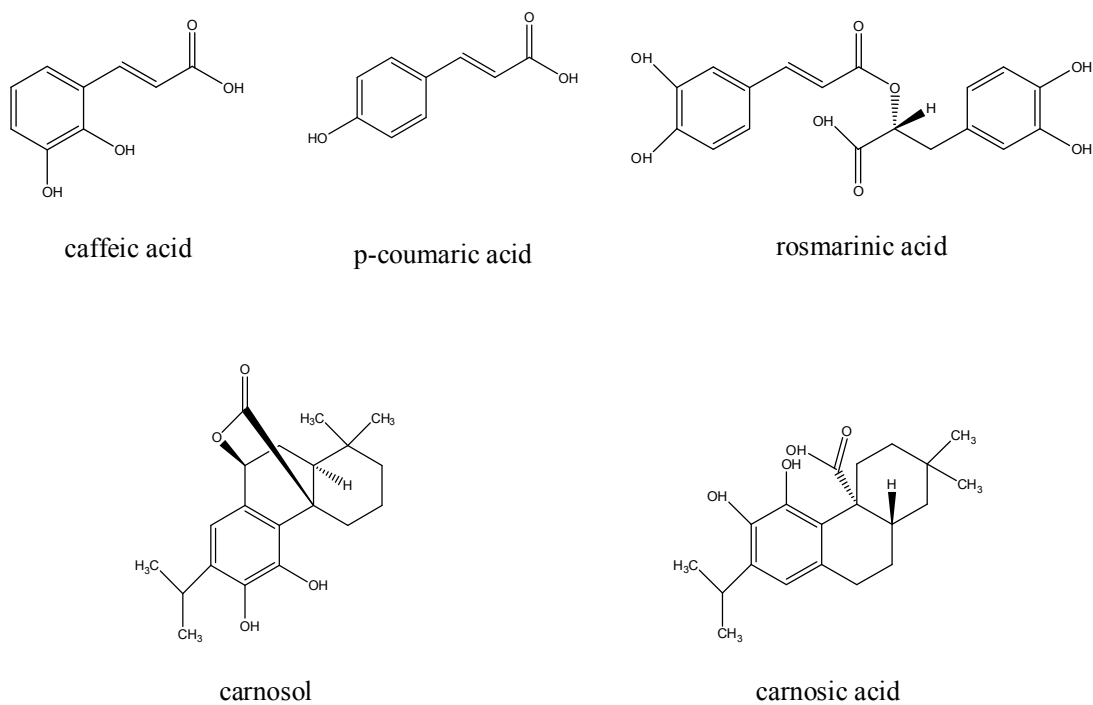
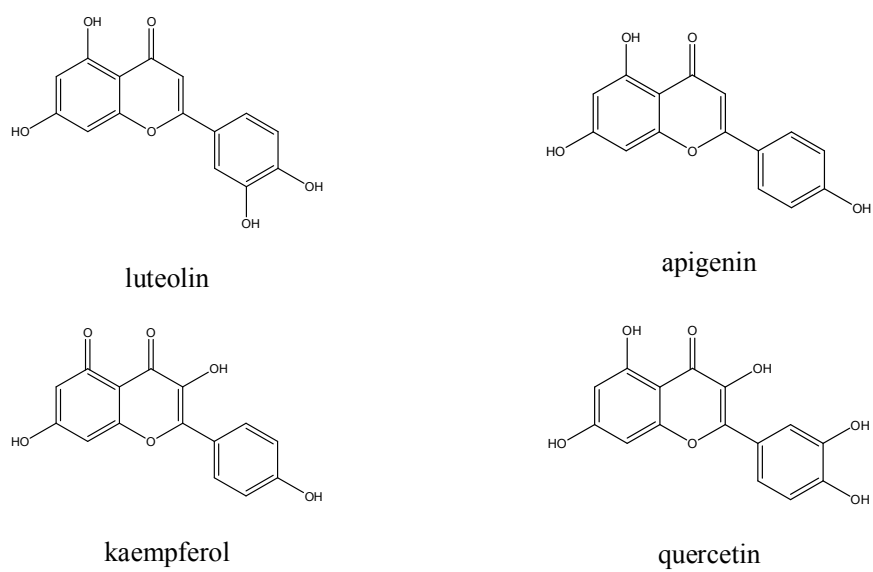
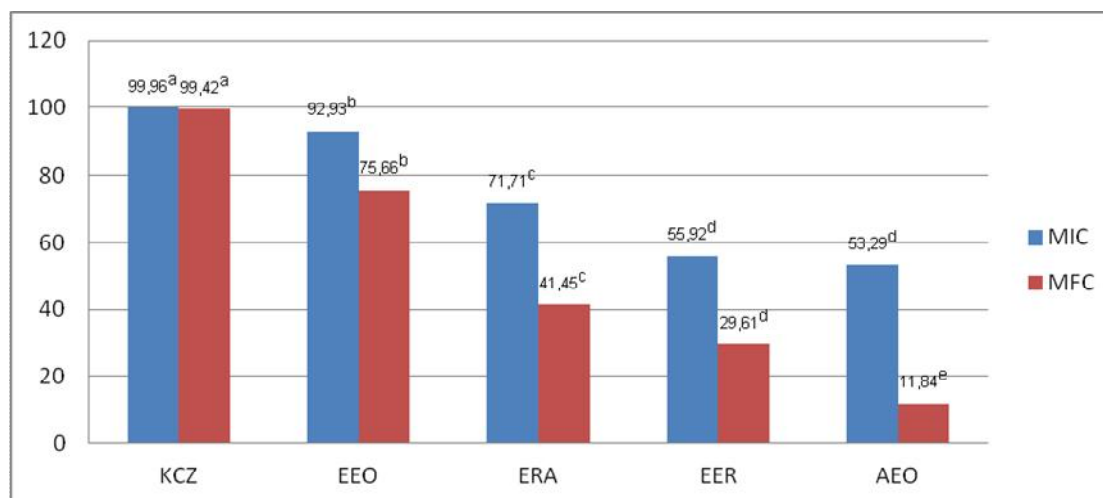
Figure 1**Figure 2**

Figure 3

Caption: KCZ – Ketoconazole; EEO - Ethanolic Extract of Oregano; ERA - Aqueous Extract of Rosemary; EER - Ethanolic Extract of Rosemary; AEO - Aqueous Extract of Oregano.

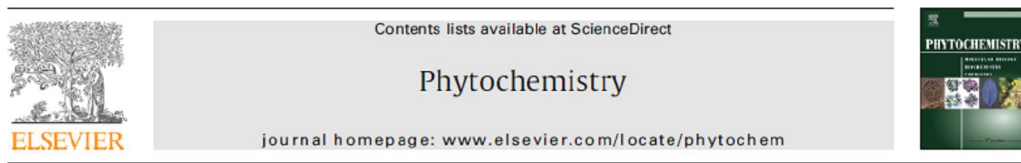
4.2 Artigo II

Determinação do perfil químico e atividade anti-*Malassezia* dos extratos de alecrim e orégano

Gabriela Hörnke Alves, Daiane Einhardt Blank, Cláudia Andrea Lima Cardoso,
Rosema Santin, Marlete Brum Cleff, Rogério Antonio Freitag*

Artigo formatado conforme as normas da revista **Phytochemistry**

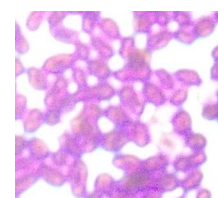
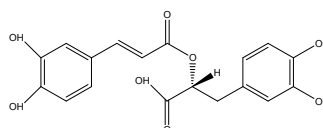
Status: a ser submetido



**Determinação do perfil químico e atividade anti-*Malassezia*
dos extratos de alecrim e orégano**

pp. 1-20

Gabriela Hörnke Alves, Daiane Einhardt Blank, Cláudia Andrea Lima Cardoso,
Rosema Santin, Marlete Brum Cleff, Rogério Antonio Freitag^{*}



Compostos fenólicos dos extratos de *Rosmarinus. officinalis* e *Origanum vulgare*
foram analisados quimicamente e testados frente a isolados clínicos de tegumento
cutâneo e meato acústico externo dos cães.

Determinação do perfil químico e atividade anti-*Malassezia* dos extratos de alecrim e orégano

Gabriela Hörnke Alves

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas,
Campus Universitário do Capão do Leão, s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil
e-mail: gabiha.alves@gmail.com

Daiane Einhardt Blank

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas,
Campus Universitário do Capão do Leão, s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil
e-mail: daiane_blank@yahoo.com.br

Claúdia Andrea Lima Cardoso

Centro de Pesquisa em Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Rodovia
Dourados, Km 12, CEP 79804-970, MS, Brasil.
e-mail: claudia@uems.br

Rosema Santin

Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão,
s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil.
e-mail: seminhavet@yahoo.com.br

Marlete Brum Cleff

Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Campus Universitário do Capão do Leão,
s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil.
e-mail: emebrum@bol.com.br

Rogério Antonio Freitag *

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas,
Campus Universitário do Capão do Leão, s/nº, Caixa Postal 354, CEP 96010-900 Pelotas, RS, Brasil
e-mail: rafreitag@gmail.com

Fone +55 (53) 3275 7358 Fax + 55 53 3275 7354

RESUMO

O estudo teve como objetivos avaliar o perfil químico dos extratos aquosos e etanólicos de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e orégano (*Origanum vulgare*) e a sensibilidade dos isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis* aos extratos através do método de difusão em disco (CLSI M44-A2). Para a preparação dos extratos foram utilizadas folhas das plantas com etanol e água, separadamente, posteriormente a identificação química dos compostos fenólicos foi realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) em comprimentos de onda diferentes. Com a análise química a presença do ácido rosmarínico foi detectada em 240 e 325 nm, no entanto os demais ácidos, diterpenos fenólicos e flavonóides foram identificados em 325 nm, com exceção do flavonoide caempferol que foi detectado em 240 nm. Através do teste de difusão em disco foi possível observar que a levedura não se mostrou sensível aos extratos aquosos de alecrim e orégano. No entanto os extratos etanólicos de alecrim e orégano mostraram halo de inibição de 6,962 mm e 4,771 mm, respectivamente, demonstrando assim diferença significativa entre os extratos frente à levedura testada. Sendo assim os extratos etanólicos de *R. officinalis* e *O. vulgare* por possuírem compostos bioativos devem ser melhor estudados como promissores fitoterápicos em medicina veterinária.

Palavras-chave: *Rosmarinus officinalis*, *Origanum vulgare*, Lamiaceae, HPLC, *Malassezia*, difusão.

1. Introdução

Ao longo da história, as plantas têm sido utilizadas como fonte de alimentos, combustíveis e medicamentos, entre outros fins. E na atualidade, extratos vegetais e outros derivados de plantas estão sendo amplamente aplicado em formulações fitoterápicas, compostos isolados e em associação com fármacos convencionais (Ansarullah et al., 2009; Van Der Kooy et al., 2009). A bioprospecção se tornou muito relevante na atualidade, em vista das dificuldades com relação à terapia antimicrobiana. Existe ainda a possibilidade de uso no tratamento alternativo ou concomitante de infecções fúngicas, como na malasseziose ótica e cutânea nos animais, pois a utilização de antifúngicos tópicos e sistêmicos por um período prolongado geralmente é necessária, sendo os imidazóis como o cetoconazol, um dos fármacos mais utilizado. No entanto, esses fármacos além de interferir nos microrganismos comensais que competem com *M. pachydermatis* podem causar resistência dos agentes facilitando sua multiplicação (Scott et al., 2001; Machado et al., 2010; Carfachia et al., 2012). Diversos estudos comprovam a relevância deste microrganismo em patologias dermatológicas em cães, tornando-se um alvo terapêutico a ser explorado (Nobre et al. 1998; Carfachia et al., 2005; Ali et al, 2011; Melchert et al., 2011).

Rosmarinus officinalis e *Origanum vulgare*, pertencentes à família Lamiaceae, conhecidos popularmente como alecrim e orégano, são cultivados em diversos estados brasileiros, porém são nativos da Europa. Apresentam importância devido à capacidade aromática, bem como às propriedades medicinais, incluindo ação hepatoprotetora, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, anticarcinogênica, dentre outras (Lampe, 2003; Srinivasan, 2005; Heinrich et al., 2006). As propriedades antioxidante e antimicrobiana dos extratos de alecrim e orégano têm sido atribuídas a uma série de substâncias representada por: diterpenos fenólicos, flavonóides e ácidos fenólicos (Almela et al., 2006; Türe et al., 2008; Hossain et al., 2011). A caracterização da composição química dos extratos pode ser feita através de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) visando à obtenção de um perfil dos compostos fenólicos obtidos através de extrações com solventes de diferentes polaridades (Hernández-Hernández et al., 2009; Herrero et al., 2010; Hossain et al., 2010; Danila et al., 2011).

Em relação à determinação da potencialidade biológica, os métodos de difusão em disco, macrodiluição e microdiluição em caldo, tem sido os mais utilizados para avaliar a capacidade antimicrobiana dos produtos de origem vegetal (Ostrosky et al., 2008; Naeini et al., 2009; Cardoso et al., 2010). Diante do exposto, o objetivo do trabalho foi determinar o perfil químico dos extratos aquoso e etanólico de *R. officinalis* e *O. vulgare* e avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos frente a levedura *Malassezia pachydermatis* isolada de casos clínicos de cães .

2. Resultados e Discussão

2.1 Identificação dos constituintes fenólicos

A análise por HPLC-DAD foi realizada para delinear os principais compostos fenólicos (**Fig. 1**) presentes nos extratos aquosos e etanólicos de alecrim e orégano, os resultados estão apresentados nos cromatogramas (**Fig. 2 - 5**).

Através da análise dos cromatogramas do extrato aquoso de alecrim (**Fig. 2**), o ácido p-cumárico pode ser observado apenas no comprimento de onda de 325 nm e o ácido rosmarínico pode ser observado em ambos os comprimentos de onda (240 e 325nm) analisados por cromatografia líquida. Com relação aos diterpenos fenólicos, carnosol e ácido carnósico, é possível observar que o primeiro é identificado no comprimento de onda 240 nm enquanto que o ácido carnósico em um espectro de 325 nm. Os flavonóides quercetina e luteolina são observados em ambos cromatogramas. Enquanto que o caempferol é observado no comprimento de onda menor, a apigenina é identificada no maior.

Na **Fig. 3** podem ser observados os cromatogramas dos extratos aquosos de orégano, nos quais são identificados o ácido p-cumárico no em 325 nm e o ácido rosmarínico em ambos comprimentos de onda, de forma análoga a que acontece no extrato aquoso de alecrim. O ácido carnósico foi observado em 325 nm e o campferol em 240 nm, semelhante às análises do extrato aquoso de alecrim, no entanto o carnosol não foi identificado nesse extrato analisado. A quercetina, luteolina e apigenina podem ser observadas no comprimento de onda maior.

Os extratos etanólicos de alecrim (**Fig. 4**) e orégano (**Fig. 5**) também foram analisados em comprimentos de onda de 240 nm e 325 nm, no entanto no cromatograma de 240nm do alecrim foi identificado apenas o flavonóide caempferol concordando com as análises do extrato aquoso para esse composto fenólico, enquanto que no cromatograma 240nm do orégano além do flavonóide também foi identificado o ácido rosmarínico. A composição química do extrato etanólico de alecrim é semelhante a do etanólico de orégano conforme pode ser observada em comprimento de onda de 325nm, pois em ambos estão presentes o ácido caféico, ácido rosmarínico, carnosol, ácido carnósico, quercetina, luteolina e apigenina, no entanto o ácido p-cumárico apenas no extrato de orégano.

Em estudos realizados com o *R. officinalis* e *O. vulgare* visando identificação de grupos fenólicos com técnica de CLAE-DAD foram utilizados os comprimentos de onda de 280 nm para derivados do ácido hidroxibenzóico, flavan-3-óis e dihidrocalcones, os derivados do ácido hidroxicinâmico a 320 nm e os flavonóides a 360 nm. De acordo com os resultados foi possível identificar os ácidos rosmarínico, caféico e gálico, os diterpenos fenólicos carnosol e ácido carnósico e os flavonóides luteolina-7-O-glucosídeo e apigenina-7-O-glucosídeo, os quais estão de acordo com os resultados do nosso estudo (Shun et al., 2005; Hossain et al., 2011).

Chun et al.(2005) demonstrou que extratos de *O. vulgare* analisados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de diodos (CLAE-DAD) utilizando os comprimentos de onda 306nm a 333 nm, apresentaram os ácidos caféico, cumárico e rosmarínico, bem como o flavonóide quercetina, os quais eram compostos de interesse nesse estudo. O ácido rosmarínico e o ácido carnósico também foram identificados em um estudo que visou avaliar a composição de extratos aquosos e etanólicos de *R. officinalis* obtidos por diferentes técnicas de extração, foram analisados por CLAE-DAD utilizando um comprimento de onda de 284 nm, os resultados mostraram um bom monitoramento utilizando esse método (Rodriguez-Rojo et al., 2012).

Os ácidos caféico, cumárico, ferúlico e rosmarínico, bem como os flavonóides quercetina, rutina, luteolina, apigenina e caempferol foram identificados e monitorados em extratos hidroalcológicos de *O. vulgare* utilizando comprimentos de onda de 320 a 370 nm, através de CLAE-DAD, sendo semelhante com os resultados do nosso estudo (Danila et al., 2011). Enquanto que Baño et al. (2003) e Bai et al. (2010) em estudo com extratos de *R. officinalis*, analisados em 280 nm por CLAE-DAD, identificou os diterpenos fenólicos carnosol e ácido carnósico, o ácido rosmarínico e os flavonóides caempferol e luteolina, semelhantes ao observado em nosso estudo.

Essas diferenças de comprimentos de onda nas análises podem ocorrer devido a mistura dos padrões, bem como a complexidade das amostras e condições de análise, devido a isso é importante ressaltar que ao analisar uma amostra com diversos grupos de compostos fenólicos é extremamente relevante considerar a utilização de comprimentos de onda diferentes para que seja possível monitorar todos os compostos de interesse e assim demonstrar as possibilidades de utilização em outros extratos analisados.

2.2 Susceptibilidade antifúngica pelo método de difusão em disco

A sensibilidade dos isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis* (n = 35) frente dos extratos de alecrim e orégano foi avaliada através do teste de difusão em disco e os resultados analisados estatisticamente estão descritos na Tabela 1.

De acordo com os resultados os extratos aquosos de alecrim e orégano não apresentaram poder inibitório frente aos isolados clínicos de *M. pachydermatis* testados, pois não foram observados halos inibitórios em nenhuma das placas produzidas, talvez essa fato possa ser explicado pela ausência de ácido caféico nesses extratos, bem como pela possibilidade de diferença de concentração dos compostos bioativos nos extratos aquosos de alecrim e orégano quando comparados com os extratos etanólicos dessas plantas.

No dimetilsulfóxido (DMSO) 10% utilizado como controle, houve crescimento do microrganismo sem formação de halo, confirmando assim que esse diluente não interferiu nos testes de difusão em disco. Um fator muito relevante a ser considerado, pois o DMSO tem sido utilizado na solubilização de

fármacos, pois esse produto possui diversas ações farmacológicas de baixa toxicidade. Isso se deve ao fato de ter a capacidade de aumentar a permeabilidade celular de membranas biológicas, permitindo assim o uso de concentrações menores de drogas e assim potencializar a eficácia sobre fungos, bactérias, parasitas e vírus (Brayton, 1986; Alves, 1998; Santos e Martins, 2008).

Os resultados para os extratos etanólicos de alecrim e orégano mostraram halo de inibição de 6,962 mm e 4,771mm, respectivamente, demonstrando assim diferença significativa ($p < 0,05$) entre os extratos frente a levedura testada, sendo que o extrato etanólico de alecrim teve um halo de inibição maior.

Na Tabela 2 estão descritos os resultados da análise dos isolados clínicos de *M. pachydermatis* de tegumento cutâneo e meato acústico externo dos cães, frente aos diferentes extratos, sendo que os extratos aquosos não formaram halos de inibição. E ao analisarmos é possível observar que as cepas responderam igualmente aos extratos etanólicos de alecrim e orégano não demonstrando assim diferença estatística quando avaliados em relação à sensibilidade e origem dos isolados clínicos.

Rusenova e Parvanov (2009) ao analisar a levedura *M. pachydermatis* frente ao óleo de *O. vulgare* demonstrou inibição pelo óleo essencial, utilizando difusão em disco, com halo de inibição de 35mm. Sendo que *O. vulgare* mostrou-se com potencial um antifúngico, no entanto os óleos são constituídos de terpenos como o 4-terpineol, α -terpineol, 4-terpineno, timol e carvacrol, entre outros (Cleff et al., 2010), diferentemente dos extratos que apresentam em sua composição ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos e flavonóides, os quais foram demonstrados nos resultados do nosso estudo.

Os extratos etanólicos de alecrim e orégano possuem uma composição muito semelhante, pois ambos possuem os ácidos rosmarínico, caféico e carnósico, bem como o carnosol, luteolina, apigenina, caempferol e quercetina. No entanto o ácido p-cumárico está presente apenas no extrato de *O. vulgare*.

Um aspecto muito relevante a se considerar é a concentração dos componentes no extrato de cada planta, visto que existe uma mistura e não uma molécula isolada, frente a isso é de extrema importância considerar a possibilidade de existência de um sinergismo entre os compostos frente a *M. pachydermatis* para obtenção da atividade de inibição. Sabe-se que a parede celular das leveduras do gênero *Malassezia* é muito fina, a qual é envolta por uma camada capsular ou lamelar a qual contém lipídeos, no entanto ainda não existem descritos mecanismos de ação dos extratos na levedura (Ashbee, 2007).

O método de difusão em disco é muito utilizado inicialmente na triagem de diversos extratos e seus compostos isolados visando avaliar a atividade frente ao microrganismo testado, para impulsionar novos estudos na busca de uma concentração eficaz no tratamento da enfermidade explorada. No entanto esse método limita a ação do extrato, existe uma barreira física, o disco, além disso, há uma limitação na atuação do extrato, pois esse fica retido em um lugar na placa, podendo atuar apenas nas colônias das leveduras mais próximas. Até o momento não existem muitos trabalhos que testam extratos de *O. vulgare* e *R. officinalis* frente a essa levedura pelo teste de difusão em disco, pois a maioria dos estudos estão direcionados a microdiluição em caldo visando a obtenção de concentrações

inibitória e fungicida, no entanto deve-se considerar que esse método além de ser de fácil execução pode auxiliar na descoberta inicial de novas fontes de compostos bioativos, que posteriormente estimulem a busca pela concentração biologicamente ativa (Ostrosky et al., 2008; Prestes et al., 2008; Cleff et al., 2010).

Alguns estudos com a *Candida albicans* demonstraram que extratos etanólicos, metanólicos e óleo essencial de *R. officinalis* possuem capacidade de formação de halo de inibição com resultados de 8mm, 10mm e 30mm, respectivamente, essa diferença de atividade está diretamente relacionada com a diferença de composição dos extratos e óleos, e também ao microrganismo utilizado para o teste, mas o trabalho demonstra a eficácia maior do óleo essencial na inibição da levedura, enquanto o diâmetro para o extrato etanólico foi próximo aos valores observados em nosso estudo (Braga et al., 2007; Oskay e Sari, 2007; Naeini et al., 2009).

Desta forma a busca de compostos bioativos em plantas medicinais para auxiliar na terapêutica da malasseziose é desejado, visto que essa enfermidade necessita de uso prolongado de antifúngicos em seu tratamento, sendo que os extratos etanólicos de alecrim e orégano parecem promissores fitoterápicos.

3. Conclusões

Os extratos etanólicos de *R. officinalis* e *O. vulgare* apresentaram atividade inibitória em isolados clínicos de *M. pachydermatis*, sendo que os compostos químicos presentes em todos os extratos foram o ácido rosmarínico, ácido carnósico, luteolina, apigenina, caempferol e quercetina, os quais devido ao potencial inibitório merecem desta forma a continuidade de estudos de atividade biológica.

4. Experimental

4.1 Procedimentos gerais experimentais

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. Coluna Cromatográfica com fase estacionária C18 Phenomenex Gemini (25cm x 4,6mm x 5 µm) e uma pré-coluna de mesma fase. Fase móvel binária de água com 6% de ácido acético e 2mM de acetato de sódio (eluente A) e acetonitrila (eluente B), fluxo de 1 mL min⁻¹, temperatura de 25°C e volume de injeção de 10 µL. O seguinte gradiente aplicado: 0 min, 5% B; 45 min, 15% de B; 55 min, 30% de B; 60 min, 50% de B; 65 min, 100% de B, e finalmente, em 75 min. 5% de B. Os compostos

separados foram monitorados com DAD. Os cromatogramas apresentados neste estudo foram registrados em 240 nm e 325 nm.

Os padrões utilizados foram adquiridos através da Sigma Aldrich® com elevado teor de pureza conforme mostra a Tabela 3, sendo solubilizados em metanol e água 50:50 v/v. A água destilada e deionizada foi ultra purificada empregando um sistema da marca Human UP 900/Scholar-UV, com seis colunas de troca iônica, lâmpada germicida 185/254 nm, filtro de carvão ativado e filtro de saída de 0,22 µm. A solução de extratos aquosos foram solubilizadas em água ultrapura em balão volumétrico individualmente. As soluções de extratos etanólicos foram solubilizadas em metanol e foram preparadas em balão volumétrico individualmente.

4.2 Material vegetal

As folhas secas de *Rosmarinus officinalis* e *Origanum vulgare* utilizados foram adquiridos da empresa Luar Sul Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios – Santa Cruz do Sul/RS, com especificação do produto e número de lote 001/2011.

4.3 Preparação dos extratos

Na obtenção do extrato aquoso bruto, de ambas as plantas, utilizou-se 25g de folhas secas e 250 mL de água destilada. A amostra vegetal e a água foram colocadas em balão de 500 mL com fundo redondo e mantidos sob agitação constante, em chapa de aquecimento com banho de óleo, até temperatura de 65° a 70°C. Essa técnica foi repetida até a obtenção de três extrações, que foram homogenizadas. Após, o extrato aquoso bruto foi acondicionado em bandejas metálicas e congelado a -70°C para ser liofilizado por 48 horas. A amostra liofilizada foi acondicionada em pequenos frascos, hermeticamente fechados, para posterior utilização nas análises cromatográficas e testes *in vitro*. Para obtenção dos extratos etanólicos, foram utilizados 35g de folhas secas e 350mL de álcool etílico, ambos foram colocados em um balão de 500 mL e mantidos sob agitação constante em chapa de aquecimento com banho de óleo, sendo aquecidos até uma temperatura de 65°C a 70°C. Sendo mantidas nessas condições por 24h, depois de transcorrido esse tempo o extrato foi filtrado. A evaporação do álcool etílico foi realizada em um rotaevaporador até a obtenção do extrato seco.

4.4 Teste de suscetibilidade antifúngica

Nesse estudo foram utilizados isolados clínicos de *Malassezia pachydermatis* coletados de peles (n=6) e orelhas de cães (n=29), que foram identificados no Laboratório de Micologia da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Para testar a suscetibilidade antimicrobiana dos

extratos foram utilizados os métodos de difusão em disco, conforme o documento CLSI M44-A2 do Instituto de padronização clínico laboratorial, com adaptações para extratos de plantas. Para os testes, os microrganismos foram semeados com alça de Drigalski em meio Agar Sabouraud, utilizando-se inóculo na escala 0,5 de McFarland e comprimento de onda de 530 nm (60-65% de transmitância). Após, os discos estéreis (5 mm de diâmetro) foram impregnados com os extratos de orégano (200mg/mL) e alecrim (400 mg/mL) que foram colocados sobre a superfície do meio na placa. Os controles com água e dimetilsulfóxido (DMSO) 10%, pois os extratos etanólicos foram solubilizados nessa concentração de diluente. Sendo assim, todos os testes foram feitos em triplicata, após esse procedimento as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 48 horas e os resultados foram obtidos através de leitura métrica do halo de inibição utilizando uma régua.

4.5 Análise estatística

As médias das medidas do diâmetro do halo de inibição no experimento de difusão em disco, foram analisadas estatisticamente via teste “t” ($GL_{(n-1)} = 34$; $\alpha = 0,05$) (Montgomery and Runger, 2012).

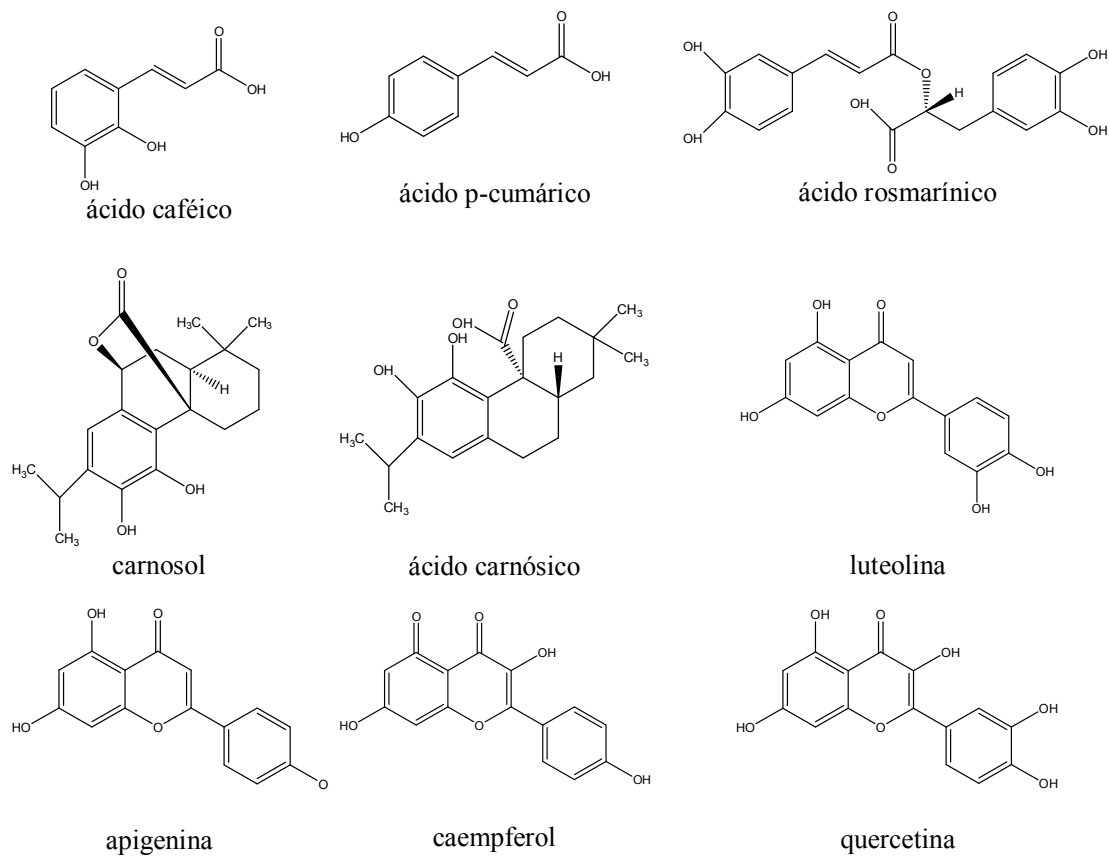


Fig. 1 Principais compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos e etanólicos de alecrim e orégano

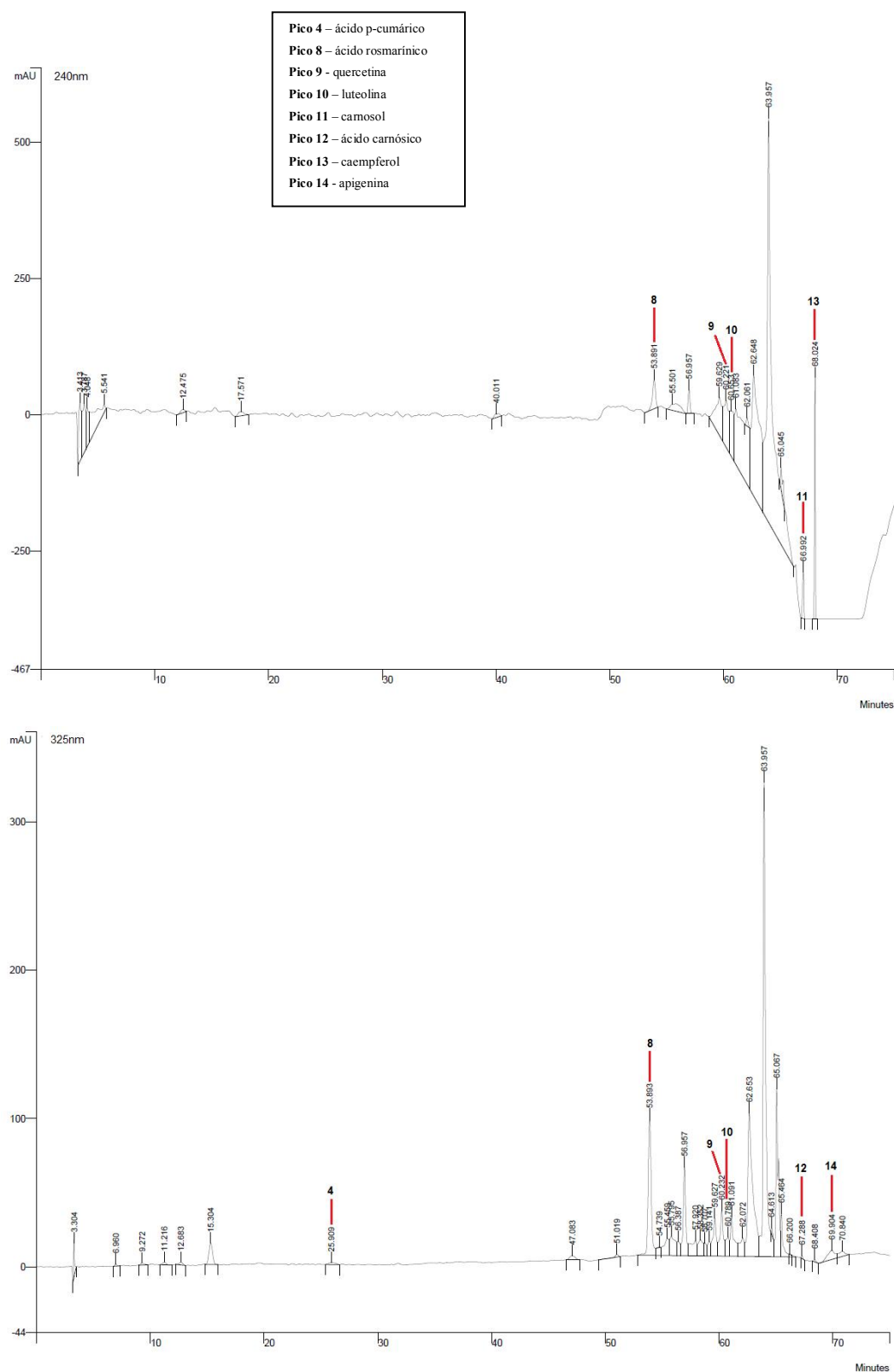
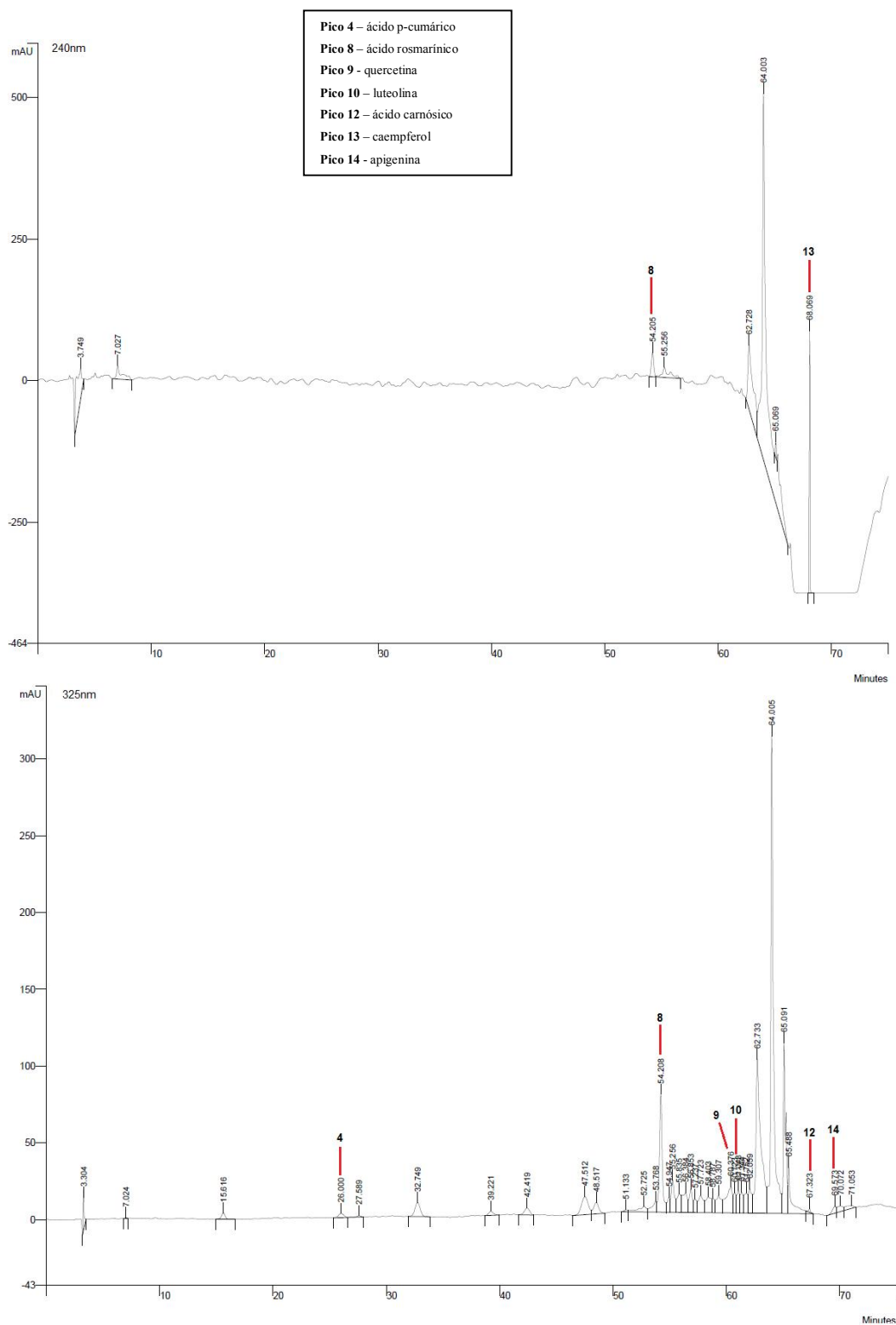


Fig. 2 Cromatogramas correspondentes às análises dos extratos aquosos de alecrim por CLAE-DAD



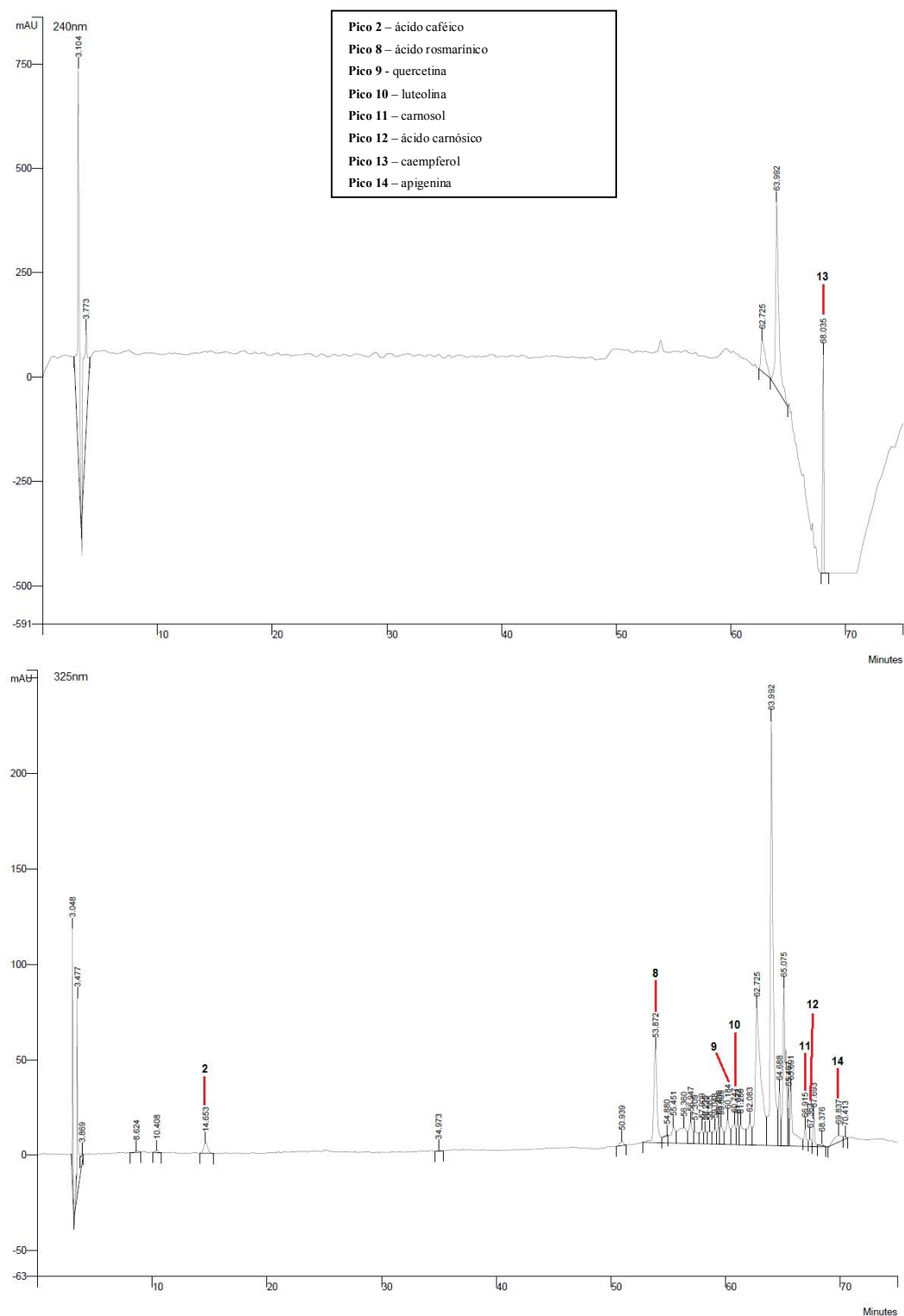


Fig. 4 Cromatogramas correspondentes às análises dos extratos etanólicos de alecrim por CLAE-DAD

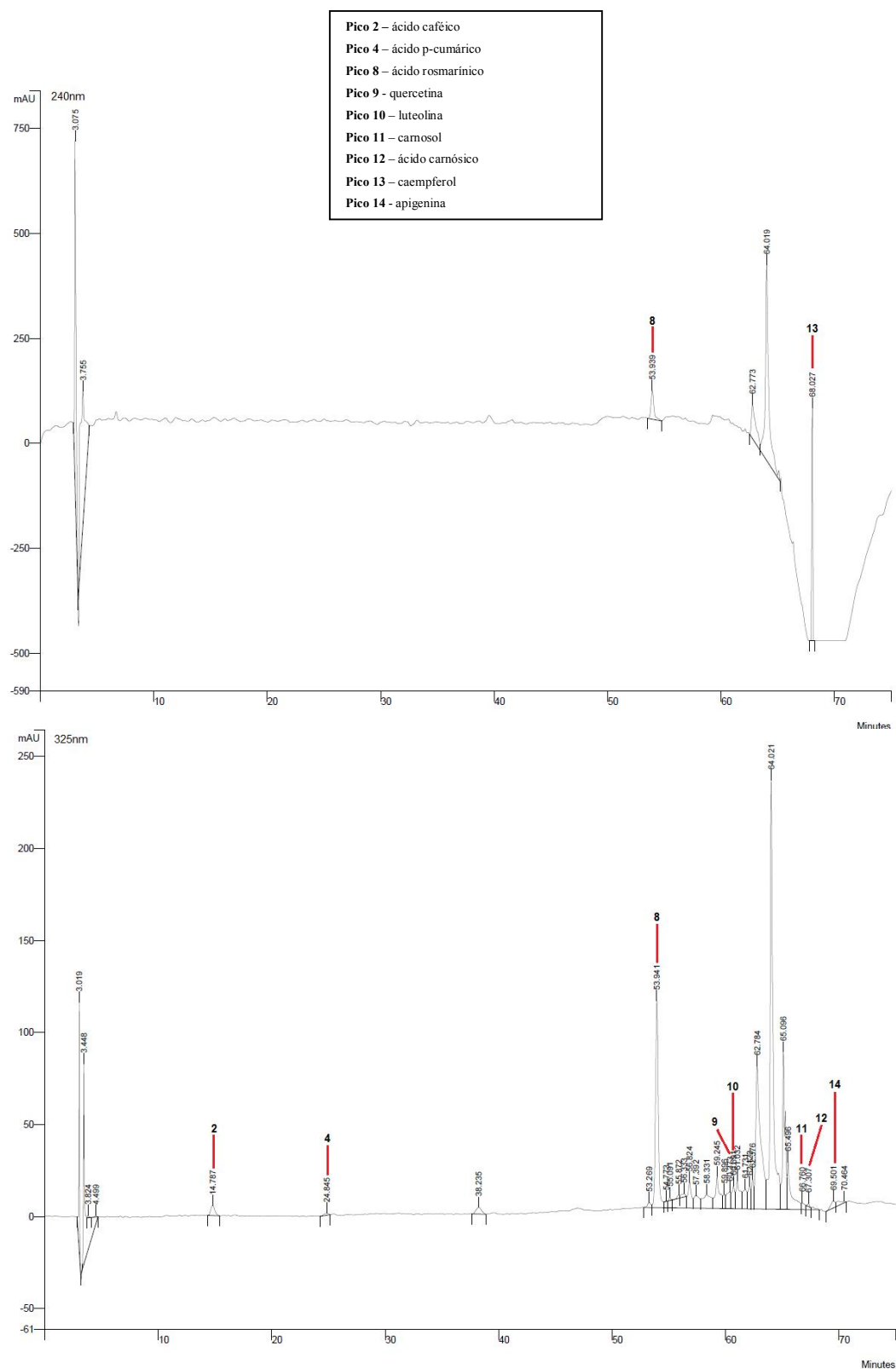


Fig. 5 Cromatogramas correspondentes às análises dos extratos etanólicos de orégano por CLAE-DAD

Tabela 1

Médias dos diâmetros do halo de inibição na análise da difusão em disco com os extratos vegetais de alecrim e orégano em *Malassezia pachydermatis* isolada de cães.

Extrato	θ (mm)
Etanólico de alecrim	6,962 ^a
Aquoso de alecrim	-
Etanólico de orégano	4,771 ^b
Aquoso de orégano	-

a, b – Letras iguais não diferem significativamente entre si, letras diferentes diferem significativamente entre si ($p < 0,05$).

Tabela 2

Médias dos diâmetros do halo de inibição na análise da difusão em disco para o extratos etanólicos e aquosos de alecrim e orégano quanto ao local de isolamento da *M. pachydermatis*

Local de isolamento	θ (mm)			
	EEA	EEO	EAA	EAO
Orelha	7,5556 ^a	5,037 ^a	-	-
Pele	7,0833 ^a	3,801 ^a	-	-

Legenda: EEO – Extrato Etanólico de Orégano; EAA – Extrato Aquoso de Alecrim; EEA – Extrato Etanólico de Alecrim; EAO – Extrato Aquoso de Orégano;

a – Letra igual significa não diferir significativamente entre si.

Tabela 3

Padrões dos compostos fenólicos com seus respectivos tempos de retenção e comprimentos de onda de máxima intensidade obtidos empregando o método de análise no HPLC-DAD.

	Substância	Pureza (%)	Tempo de retenção (min)	Comprimento de onda (nm)
1	ácido vanílico	≥97%	13,946	270
2	ácido caféico	≥ 98%	14,641	325
3	vanilina	≥99%	19,443	280
4	ácido p-cumárico	≥98%	25,480	315
5	ácido ferúlico	≥99%	31,283	325
6	ácido sinápico	≥98%	33,961	325
7	rutina	≥94%	45,695	258
8	ácido rosmarínico	≥98%	53,922	330
9	quercetina	≥98%	60,328	250
10	luteolina	≥98%	60,683	350
11	carosol	≥98%	67,013	250
12	ácido carnósico	≥97%	67,307	225
13	caempferol	≥90%	68,080	250
14	apigenina	≥95%	69,621	240

Referências

- Ali, H., Shahram, J., Mansour, B., Ali, S.A., Parviz, M., Siamak, M.R., 2011. Identification of Different *Malassezia* Species Isolated from Skin of Healthy Dog Owners in Tabriz, Iran (2010-2011). *Adv. Environ. Biol.*, 5(11), 3688-3693.
- Almela, L., Sánchez-Munoz, B., Fernández-López, J. A., Roca, M.J., Rabe, V., 2006. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. *J. Chromatogr. A*, 1120(1), 221-229.
- Alves, G.E.S., 1998. Dimetilsulfoxido (DMSO). *Saúde Equina*, 6, 6-10.
- Ansarullah, R.N.J., Thounaojam, M.C., Patel, V., Devkar, R.V., Ramachandran, A.V., 2009. Antihyperlipidemic potential of a polyherbal preparation on triton WR 1339 (Tyloxapol) induced hyperlipidemia: a comparison with lovastatin. *Int. J. Green Pharm.*, 3, 119-124.
- Ashbee, H.R., 2007. Update on the genus *Malassezia*. *Med Mycol*, 45, 287-303.
- Bai, N., He, K., Roller, M., Lai, C., Shao, X., Pan, M., Ho, C., 2010. Flavonoids and Phenolic Compounds from *Rosmarinus officinalis*. *J. Agric. Food Chem.*, 58, 5363-5367.
- Braga, F.G., Bouzada, M.L.M., Fabri, R.L., Matos, M.O., Moreira, F.O., Scio, E., Coimbra, E.S., 2007. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol*, 111, 396-402.
- Brayton, C.F., 1986. Dimetyl suloxide (DMSO): a review. *Cornell Vet.*, 76, 61-90.
- Cafarchia, C., Gallo, S., Romito, D., Capelli, G., Chermette, R., Guillot, J., Otranto, D., 2005. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. *J Vet Diagn Invest*, 17, 316-322.
- Cafarchia, C., Figueredo, L.A., Iatta, R., Montagna, M.T., Otranto, D., 2012. In vitro antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* from dogs with and without skin lesions. *Vet Microbiol*, 155, 395-398.
- Cardoso, R.L., Maboni, F., Machado, G., Alves, S.H., Vargas, A.C., 2010. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vet Microbiol*, 142, 432-434.
- Chun, S., Vatter, C.D.A., Lin, Y., Shetty, K., 2005. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. *Process Biochem.*, 40, 809-816.
- Cleff, M.B., Meinerz, A.R., Faria, R.O., Xavier, M.O., Santin, R., Nascente, P.S., Rodrigues, M.R., Meireles, M.C.A., 2010. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 62(5), 1291-1294.

- Danila, A.O., Gatea, F., Radu, G.L., 2011. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. *Chem. Nat. Compd.*, 47(1), 22-26.
- Del Baño, M.J., Lorente, J., Castillo, J., Benavente-García, O., Del Río, J.A., Ortuño, A., Quirin, K., Gerard, D., 2003. Phenolic Diterpenes, Flavones, and Rosmarinic Acid Distribution during the Development of Leaves, Flowers, Stems, and Roots of *Rosmarinus officinalis*. Antioxidant Activity. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 4247-4253.
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M., 2006. Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. *J Ethnopharmacol*, 107, 157–160.
- Hernández-Hernández, E., Ponce-Alquicira, E., Jaramillo-Flores, M.E., Guerrero, I.L., 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Sci*, 81, 410–417.
- Herrero, M., Plaza, M., Cifuentes, A., Ibáñez, E., 2010. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra- performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and in-vitro assays. *J. Chromatogr. A*, 1217, 2512–2520.
- Hossain, M.B., Rai, D.K., Brunton, N.P., Martin-Diana, A.B., Barry-Ryan, C., 2010. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. *J. Agric. Food Chem*, 58, 10576–10581.
- Hossain, M.B., Barry-Ryan, C., Martin-Diana, A.B., Brunton, N.P., 2011. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. *Food Chem*, 126, 339–346.
- Lampe, J.W., 2003. Spicing up a vegetarian diet: Chemopreventive effects of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.*, 78(3), 579-583.
- Machado, M.L.S., Ferreira, L., Ferreira, R R., Corbellini, L.G., Deville, M., Berthelemy, M., Guillot, J., 2010. *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. *Vet Dermatol*, 22(1), 46-52.
- Melchert, A., Jefery, A.B.S., Giuffrida, R., 2011. Avaliações citológicas em otites caninas por *Malassezia* spp.: estudo retrospectivo. *Colloquium Agrariae*, 7(2), 27-34.
- Montgomery, D.C., Runger, G.C., 2012. Estatística Aplicada e Probabilidade para Engenheiros, quinta ed. LTC, Rio de Janeiro.
- Naeini, A., Khosravi, A.R., Chitsaz, M., Shokri, H., Kamlnejad, M., 2009. Anti-*Candida albicans* activity of some Iranian plants used in traditional medicine. *J Mycol Med*, 19, 168—172.

- Nobre, M., Meireles, M., Gaspar, L.F., Pereira, D., Schramm, R., Schuch, L.F., Souza, L. 1998. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites e dermatites em cães. *Ciência Rural*, 28(3), 447-452.
- Oskay, M., Sari, D., 2007. Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. **Pharm Biol**, 45(3), 176–181.
- Ostrosky, E.A., Mizumoto, M.K., Lima, M.E.L., Kaneko, T.M., Nishikawa, S.O., Freitas, B.R., 2008. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Rev. Bras. Farmacogn*, 18(2), 301-307.
- Prestes, L.S., Frascolla, R., Santin, R., Santos, M.A.Z., Schram, R.C., Rodrigues, M.R.A., Schuch, L.F.D., Meireles, M.C.A., 2008. Extracts from oregano and thyme against external otitis-associated microorganisms. *Rev Cubana Plant Med*, 13(4).
Disponível em:
<http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962008000400003&lng=es&nrm=iso>. Acessado em: 13 fev. 2013.
- Rodríguez-Rojó, S., Visentin, A., Maestri, D., Cocero, M.J., 2012. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. *J. Food Eng.*, 109, 98–103.
- Rusenova, N., Parvanov, P., 2009. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. **Trakia J Sci**, 7(1), 37-43.
- Santos, J.A., Martins, L.A., 2008. Atividade *in vitro* de antifungos frente a isolados de *Malassezia* spp. de animais atendidos no Hospital Veterinário da Unipar. *Arq. ciênc. vet. zool. UNIPAR*, 11(2), 175-178.
- Scott, D.W., Miller, W.H., Griffin, C.E., 2001. *Small Animal Dermatology*, sexta.ed. W.B. Saunders, Philadelphia.
- Shun, B., Cai, Y.Z., Sun, M., Corke, H., 2005. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 7749-7759.
- Srinivasan, K., 2005. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. *Food Res Int*, 38(1), 77–86.
- Türe, H., Eroglu, E., Soyer, F., Özen, B., 2008. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. *Int J Food Sci Tech*, 43, 2026–2032.
- Van Der Kooy, F., Maltese, F., Choi, Y.H., Kim, H.K., Verpoorte, H., 2009. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. *Planta Med.*, 75, 763–775.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir dos resultados apresentados e discutidos nesse estudo foram elaboradas as seguintes considerações:

1. A obtenção dos extratos e identificação de compostos fenólicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permitiu uma boa caracterização química.
2. Os extratos apresentaram como perfil químico os ácidos fenólicos, diterpenos fenólicos e flavonóides.
3. A análise cromatográfica deve ser realizada em comprimentos de onda diferentes (240nm e 325nm) visando a obtenção de um delineamento de compostos de classes diferentes, por comparação com os padrões cromatográficos.
4. Através do teste de microdiluição em caldo pode-se observar que o extrato etanólico de orégano foi o mais eficaz frente a *M. pachydermatis*, seguido dos demais extratos.
5. Os extratos aquosos de orégano e alecrim não foram eficazes no teste de difusão em disco frente à levedura testada.
6. Os extratos etanólicos de alecrim e orégano, através do método de difusão em disco, apresentaram atividade inibitória frente a isolados de *M. pachydermatis*.
7. Os extratos de *R. officinalis* e *O. vulgare* podem ser considerados fonte de compostos bioativos que devem ser melhor estudados para contribuir no desenvolvimento de um tratamento para malasseziose.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALI, H.; SHAHRAM, J.; MANSOUR, B.; ALI, S. A.; PARVIZ, M.; SIAMAK, M. R. Identification of Different *Malassezia* Species Isolated from Skin of Healthy Dog Owners in Tabriz, Iran (2010-2011). **Advances in Environmental Biology**, v.5, n.11, p.3688-3693, 2011.

ALI, H.; SHAHRAM, J.; MANSOUR, B.; ALI, S. A.; PARVIZ, M.; SIAMAK, M. R.; MAHMOUD, B. Identification of Different *Malassezia* Species Isolated from Skin of Healthy Dog Owners in Tabriz, Iran. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v.11, n.3, p.421-425, 2012.

ALMEIDA, D. M., CHAVES, L. L., DEL-VECHIO-VIEIRA, G., PINHO, J. J. R. G., YAMAMOTO, C. H., SOUSA, O. V. Teores de óleo essencial e flavonóides totais em amostras de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.91, n.4, p.170-175, 2011.

ALMELA, L.; SÁNCHEZ-MUNOZ, B.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J. A.; ROCA, M. J.; RABE, V. Liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of phenolics and free radical scavenging activity of rosemary extract from different raw material. **Journal of Chromatography A**, v.1120, n.1, p.221-229, 2006.

ANDRADE, S.F. **Manual de Terapêutica Veterinária**, 3.ed. Roca, 2008. 936 p.

ANGUS, J.C. Otic cytology in health and disease. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.34, n.2, p.411-424, 2004.

ARAÚJO, S. A. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; LIMA, F. E. S.; RICARTE, A.R.F.; COSTA, E. C.; MIRANDA, A. M. Usos potenciais de *Melia azedarach* L. (meliaceae): um levantamento. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.76, n.1, p.141-148, 2009.

ARCILA-LOZANO, C. C.; LOARCA-PIÑA, G.; LECONA-URIBE, S.; MEJÍA, E. G. El orégano: propiedades, composición, y actividad biológica de sus componentes. **ALAN**, v.54, n.1, 2004.

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

ASHRAF, Z.; MUHAMMAD, A.; IMRAN, M.; TAREQ, A. H. *In vitro* antibacterial and antifungal activity of methanol, chloroform and aqueous extracts of *Origanum vulgare* and their comparative analysis. **International Journal of Organic Chemistry**, v.1, p.257-261, 2011

ASPIROZ, C.; GILABERTE, Y.; REZUSTA, A.; BOEKHOUT, T.; RUBIO, C. Gentamycin inhibits the growth of *Malassezia pachydermatis* in culture. **Revista Iberoamericana de Micología**, v.27, n.1, p.20–21, 2010.

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**, v.58, p.5363–5367, 2010.

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.9, n.9, p.48 – 55, 2010.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas Aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora Ltda, 2009. 190p.

BOGDADI, H. A. A.; KOKOSKA, L.; HAVLIK, J.; KLOUCEK, P.; RADA, V.; VORISEK, K. In Vitro Antimicrobial Activity of Some Libyan Medicinal Plant Extracts. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.5, p.386–391, 2007.

BOND, R.; FERGUSON, E. A.; CURTIS, E. F.; CRAIG, J. M.; LLOYD, D. H. Factors associated with elevated cutaneous *Malassezia pachydermatis* populations in dogs with pruritic skin disease. **Journal of Small Animal Practice**, v.37, n.3, p.103-107, 1996.

BOND, R. *Malassezia pachydermatis* enfermedad dermatológica canina. **Waltham Focus**, v.7, p.27-31, 1997.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in

traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.396–402, 2007.

CAFARCHIA, C.; GALLO, S.; ROMITO, D.; CAPELLI, G.; CHERMETTE, R.; GUILLOT, J.; OTRANTO, D. Frequency, body distribution, and population size of *Malassezia* species in healthy dogs and in dogs with localized cutaneous lesions. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**, v.17, p.316–322, 2005.

CARVALHO, J. C. T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. P. Compostos fenólicos simples e heterosídeos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2003, p. 468-495.

CASTRO, L. O.; CHEMALE, V. M. **Plantas Medicinais, condimentares e aromáticas: Descrição e Cultivo**. Guaíba: Livraria e Editora Agropecuária, 1995, p.9-10.

CAVALEIRO, C.; PINTO, E.; GONÇALVES, M. J.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal Applied Microbiology**, v.100, p.1333-1338, 2006.

CELIK TAS, O. Y.; KOCABAS, E.E. H.; BEDIR, E.; SUKAN, F. V.; OZEK, T.; BASER, K. H. C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v.100, p.553–559, 2007.

CHEN, T.; HILL, P. B. The biology of *Malassezia* organisms and their ability to induce immune responses and skin disease. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.4-26, 2005.

CHUN, S.; VATTEM, C. D. A.; LIN, Y.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v.40, p.809–816, 2005.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.62, n.5, p.1291-1294, 2010.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.M.; MADRID, I.; FONSECA, A.O.; ALVES, G.H.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A. 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.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; DO SACRAMENTO, L. V. S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p.272-278, 2005.

COUTINHO, S. D.; PAULA, C. R. Proteinase, phospholipase, hyaluronidase and chondroitin-sulphatase production by *Malassezia pachydermatis*. **Medical Micology**, v.38, p.73-76, 2000.

CRESPO, M. J.; ABARCA, M. L.; CABAÑES, F. J. Occurrence of *Malassezia* spp. in the external ear canals of dogs and cats with or without otitis externa. **Medical Mycology**, v.40, n.2, p.115-121, 2002.

CUNHA, A. P., DA SILVA, A. P., ROQUE, O. R. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. 729p.

DANILA, A. O.; GATEA, F.; RADU, G. L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. **Chemistry of Natural Compounds**, v.47, n.1, p.22-26, 2011.

ESSAWI, T.; SROUR, M. Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.70, p.343–349, 2000.

FAERGEMANN, J. Atopic dermatitis and fungi. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, p.544-563, 2002.

GABAL, M. A. Preliminary studies on the mechanism of infection an characterization of *Malassezia pachydermatis* in association with canine otitis externa. **Mycopathologia**, v.104, p.93-98, 1988.

GALUPPI, R.; TAMPIERI, M.P. Epidemiology and variability of *Malassezia* spp. **Parasitologia**, v.50, p.73-76, 2008.

GIRÃO, M. D.; PRADO, M. R.; BRILHANTE, R. S. N.; CORDEIRO, R. A.; MONTEIRO, A. J.; SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. *Malassezia pachydermatis* isolated from normal and diseased external ear canals in dogs: A comparative analysis. **The Veterinary Journal**, v.172, p.544-548, 2006.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v.37, n.5, p.295-306, 1999.

GUILLOT, J.; BENSIGNOR, E.; JANKOWSKI, F.; SEEWALD, W.; CHERMETTE, R.; STEFFAN, J. Blackwell Publishing Ltd. Comparative efficacies of oral ketoconazole and terbinafine for reducing *Malassezia* population sizes on the skin of Basset Hounds. **Veterinary Dermatology**, v.14, p.153–157, 2003.

HEINRICH, M.; KUFER, J.; LEONTI, M.; PARDO-DE-SANTAYANA, M. Ethnobotany and ethnopharmacology—Interdisciplinary links with the historical sciences. **Journal of Ethnopharmacology**, v.107, p.157–160, 2006.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, E.; PONCE-ALQUICIRA, E.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; GUERRERO, I. L. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. **Meat Science**, v.81, p.410–417, 2009.

HERRERO M.; PLAZA, M.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Green processes for the extraction of bioactives from Rosemary: Chemical and functional characterization via ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and *in-vitro* assays. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p.2512–2520, 2010.

HÖFLING, J. F.; ANIBAL, P. C.; OBANDO-PEREDA, G. A., PEIXOTO, I. A T.; FURLETTI, V.F.; FOGGIO, M. A.; GONÇALVES, R. B. Antimicrobial potential of some plant extracts against *Candida* species. **Brazilian Journal of Biology**, v.70, n.4, p.1065-1068, 2010.

HOSSAIN, M. B.; BARRY-RYAN C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Effect of drying method on the antioxidant capacity of six Lamiaceae herbs. **Food Chemistry**, v. 123, p. 85–91, 2010a.

HOSSAIN, M. B.; RAI, D. K.; BRUNTON, N.P.; MARTIN-DIANA, A. B.; BARRY-RYAN, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.58, p.10576–10581, 2010b.

HOSSAIN, M. B.; BARRY-RYAN, C.; MARTIN-DIANA, A. B.; BRUNTON, N. P. Optimisation of accelerated solvent extraction of antioxidant compounds from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.), marjoram (*Origanum majorana* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) using response surface methodology. **Food Chemistry**, v.126, p.339–346, 2011.

IGBINOSA, O. O.; IGBINOSA, E. O.; AIYEGORO, O. A. Antimicrobial activity and phytochemical screening of stem bark extracts from *Jatropha curcas* (Linn). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.3, n.2, p.58-62, 2009.

JAAKOLA, L.; HOHTOLA, A. Effect of latitude on flavonoid biosynthesis in plants. **Plant, Cell and Environment**, n.33, p.1239–1247, 2010.e

JOLY, A. B. **Botânica: Introdução a taxonomia vegetal**. 1.ed. São Paulo: Cia Editora Nacional, 1987. 778p.

JOHNSON, J. J. Carnosol: A promising anti-cancer and anti-inflammatory agent. **Cancer Letters**, v.305, p.1–7, 2011.

KIVILOMPOLO, M.; OBURKA, V.; HYÖTYLÄINEN, T. Comparison of GC–MS and LC–MS methods for the analysis of antioxidant phenolic acids in herbs. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.388, p.881–887, 2007.

KIVILOMPOLO, M.; HYÖTYLÄINEN, T. On-line coupled dynamic sonication-assisted extraction–liquid chromatography for the determination of phenolic acids in Lamiaceae herbs. **Journal of Chromatography A**, v.1216, p.892–896, 2009.

KOSAR, M.; DORMAN, H. J. D.; BACHMAYER, O.; BASER, K. H. C.; HILTUNEN, R. An improved on-line HPLC-DPPH* method for the screening of free radical scavenging compounds in water extracts of lamiaceae plants. **Chemistry of Natural Compounds**, v.39, p.161-166, 2003.

LAMPE, J. W. Spicing up a vegetarian diet: Chemopreventive effects of phytochemicals. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.78, n.3, p.579-583, 2003.

LINARES, I. B.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; HERRERO, M.; IBÁÑEZ, E.; SEGURA CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. Comparison of different extraction procedures for the comprehensive characterization of bioactive phenolic compounds in *Rosmarinus officinalis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1218, p.7682– 7690, 2011.

LOPES, G. A. D.; FELICIANO, L. M.; DINIZ, R. E. S.; ALVES, M. J. Q. F. Plantas medicinais: Indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão**, v.6, n.2, p.143, 2010.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 544p.

LYSKOVA, P.; VYDRZALOVA, M.; MAZUROVA, J. Identification and antimicrobial susceptibility of bacteria and yeasts isolated from healthy dogs and dogs with otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine**, v.54, n.10, p.559-563, 2007.

MACHADO, M. L. S.; FERREIRO, L.; FERREIRA, R. R.; CORBELLINI, L. G.; DEVILLE, M.; BERTHELEMY, M.; GUILLOT, J. *Malassezia* dermatitis in dogs in Brazil: diagnosis, evaluation of clinical signs and molecular identification. **Veterinary Dermatology**, v.22, n.1, p.46-52, 2010.

MARCHIORI, V.F. **Rosmarinus officinalis**. 2004. 32f. Monografia (Curso Fitomedicina) - Fundação Herbarium, Associação Argentina de Fitomedicina, Argentina.

MATOS, J. M. D.; MATOS, M. E. O.; **Farmacognosia, curso teórico-prático**, Fortaleza: UFC, 1989. 256p.

MELCHERT, A.; JEFERY, A. B. S.; GIUFFRIDA, R. Avaliações citológicas em otites caninas por *Malassezia* spp.: estudo retrospectivo. **Colloquium Agrariae**, v.7, n.2, p.27-34, 2011.

MONTES, L. V.; BROSEGHINI, L. P.; ANDREATTA, F. S.; SANT'ANNA, M. E.; NEVES, V. M.; SILVA, A. G. Evidências para o uso do óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v.7, n.2, p.61-67, 2009. Disponível em: <<http://www.naturezaonline.com.br>>. Acesso em: 27 jun. 2012.

MULINACCI, N.; INNOCENTI, M.; BELLUMORI, M.; GIACCHERINI, C.; MARTINI, V.; MICHELOZZI, M. Storage method, drying processes and extraction procedures strongly affect the phenolic fraction of rosemary leaves: An HPLC/DAD/MS study. **Talanta**, v.85, p.167–176, 2011.

NARDONI, S.; DINI, M.; TACCINI, F.; MANCIANTI, F. Occurrence, distribution and population size of *Malassezia pachydermatis* on skin and mucosae of atopic dogs. **Veterinary Microbiology**, v.122, p.172-177, 2007.

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 Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

NASCENTE, P. S.; SANTIN, R.; MEINERZ, A. R.; 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, 2010.

NEGRE, A.; BENSIGNOR, E.; GUILLOT, J. Evidence-based veterinary dermatology: a systematic review of intervention of *Malassezia* dermatitis in dogs. **Journal Compilation**, v.20, p.1-12, 2008.

NOBRE, M.; MEIRELES, M.; GASPAR, L. F.; PEREIRA, D.; SCHRAMM, R.; SCHUCH, L. F.; SOUZA, L.; SOUZA, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes

infecciosos nas otites e dermatites em cães. **Ciência Rural**, v.28, n.3, p.447-452, 1998.

NOBRE, M.; CASTRO, A. P.; NASCENTE, P. S.; FERREIRO, L.; MEIRELES, M. C. A. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others infectious agents as cause of external otitis in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, v.32, p.245–249, 2001.

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. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p.405-408, 2005.

OLIVEIRA, L. C.; LEITE, C. A. L.; BRILHANTE, R. S. N.; CARVALHO, C. B. M. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa. **The Canadian Veterinary Journal**, v.49, n.8, p.785-788, 2008.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Biodisponibilidade de ácidos fenólicos. **Química Nova**, v.34, n.6, p.1051-1056, 2011

OSKAY, M.; SARI, D. Antimicrobial Screening of Some Turkish Medicinal Plants. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.3, p.176–181, 2007.

PARK, S. U.; UDDIN, M. R.; XU, H.; KIM, Y. K.; LEE, S. Y. Biotechnological applications for rosmarinic acid production in plant. **African Journal of Biotechnology**, v.7, n.25, p.4959-4965, 2008.

PETERSEN, M.; ABDULLAH, Y.; BENNER, J.; EBERLE, D.; GEHLEN, K.; HÜCHERIG, S.; JANIÁK, V.; KIM, K. H.; SANDER, M.; WEITZEL, C.; WOLTERS, S. Evolution of rosmarinic acid biosynthesis. **Phytochemistry**, v.70, p.1663–1679, 2009.

PRESTES, Luciana. **Avaliação *in vitro* da atividade de diferentes extratos de *Origanum vulgare* L. e *Thymus vulgaris* frente a microrganismos de importância veterinária**. 2006. 46f. Dissertação (Mestrado em Veterinária), Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

PRESTES, L. S.; FRASCOLLA, R.; SANTIN, R.; SANTOS, M. A. Z.; SCHRAM, R. C.; RODRIGUES, M. R. A., SCHUCH, L. F. D., MEIRELES, M. C. A. Extracts from oregano and thyme against external otitis-associated microorganisms. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.13, n.4, 2008. Disponível em: <http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S102847962008000400003&lng=es&nrm=iso>. Acessado em: 13 fev. 2013.

PROESTOS, C.; KAPSOKEFALOU, M.; KOMAITIS, M. Analysis of naturally occurring phenolic compounds in aromatic plants by RP-HPLC and GC-MS after silylation. **Journal of Food Quality**, v.31, p.402–414, 2008.

RODRÍDUEZ-ROJO, S.; VISENTIN, A.; MAESTRI, D.; COCERO, M. J. Assisted extraction of rosemary antioxidants with green solvents. **Journal of Food Engineering**, v.109, p.98–103, 2012.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.11, n.2, p.57-69, 2001.

ROSALES, M. S., MARSELLA, R., KUNKLE, G., HARRIS, B. L., NICKLIN, C. F., LOPEZ, J. Comparison of the clinical efficacy of oral terbinafine and ketoconazole combined with cephalexin in the treatment of *Malassezia* dermatitis in dogs – a pilot study. **Veterinary Dermatology**, v.16, p.171-176, 2005.

RUSENOVA, N.; PARVANOV, P. Antimicrobial activities of twelve essential oils against microorganisms of veterinary importance. **Trakia Journal of Sciences**, v.7, n.1, p.37-43, 2009.

SANTOS, J. A.; MARTINS, L. A. Atividade *in vitro* de antifungicos frente a isolados de *Malassezia* spp. de animais atendidos no Hospital Veterinário da Unipar. **Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da Unipar**, v.11, n.2, p.175-178, 2008.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small Animal Dermatology**. 6.ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, 1528 p.

SHUN, B.; CAI, Y. Z.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant Capacity of 26 Spice Extracts and Characterization of Their Phenolic Constituents. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.7749-7759, 2005.

SILVA, M. S. A.; SILVA, M. A. R.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; CARVALHO, A. A. T. Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* L. sobre bactérias orais planctônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.236-240, 2008.

SIMÕES, C. M. O.; SPTIZER, V. Óleos voláteis. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2003, p.468-495.

SMITH, J. M. The association of yeast with chronic otitis externa in the dog. **Australian Veterinary Journal**, v.44, p.413-415, 1968.

SRINIVASAN, K. Spices as influencers of body metabolism: an overview of three decades of research. **Food Research International**, v.38, n.1, p.77–86, 2005.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v.30, p.3268 – 3295, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; **Fisiologia Vegetal**, 4.ed.; Porto Alegre:Artmed:, 2009, 820p.

TEMPONE, A. G., SARTORELLI, P., TEIXEIRA, D., PRADO, F. O., CALIXTO, I. A., LORENZI, H., MELHEM, M. S. C. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, n.5, p.443-449, 2008.

THORSEN, M. A.; HILDEBRANDT, K. S. Quantitative determination of phenolic diterpenes in rosemary extracts: Aspects of accurate quantification. **Journal of Chromatography A**, v.995, p.119–125, 2003.

TSAI, P.; TSAI, T.; HO, S. In vitro inhibitory effects of rosemary extracts on growth and glucosyltransferase activity of *Streptococcus sobrinus*. **Food Chemistry**, v.105, p. 311–316, 2007.

TSIMOGIANNIS, D.; SAMIOTAKI, M.; PANAYOTOU, G.; OREOPOULOU, V. Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS. **Molecules**, v.12, p.593-606, 2007.

TÜRE, H.; EROGLU, E.; SOYER, F.; ÖZEN, B. Antifungal activity of biopolymers containing natamycin and rosemary extract against *Aspergillus niger* and *Penicillium roquefortii*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.43, p.2026–2032, 2008.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.289-306, 2006.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.3, p.805-813, 2009.

VARGAS, V. E. S.; GOMPERTZ, O. F.; SIDRIM, J. J. C.; JARABRAN, M. C. D. Pitiríase versicolor e doenças de *Malassezia* spp. In: SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos**. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S. A., 2004. p.112-123.

VEGARA, S.; FUNES, L.; MARTÍ, N.; SAURA, D.; MICOL, V.; VALERO, M. Bactericidal activities against pathogenic bacteria by selected constituent of plant extracts in carrot broth. **Food Chemistry**, v.128, p.872–877, 2011.

WALLMANN, J.; MARX, M. Unter besonderer Berücksichtigung des *Malassezia pachydermatis* Nachweises: Wirksamkeit von surolan bei der therapie der otitis externa des Hundes. **Der Praktisch Tierarzt**, v.8, p.16-21, 1990.

ZUANAZZI, J. A. S. Flavonóides. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/ Ed. UFSC, 2002. p. 499-526.

ANEXO 1

	ET - 006	
	Especificação Técnica	Revisão: 04 Pág. 1/1
	Orégano Folhas	Data 1ª Edição: 29/03/06
		Data Revisão: 16/11/2010

Produto/ Nome Científico

ORÉGANO FOLHAS/ ORIGANUM VULGARE L.

Descrição: Folhas secas de orégano

Propriedades:

Físico-Químicas:

Umidade: máx. 12% (g/100g)

Microbiológica:

De acordo com a legislação brasileira, Resolução RDC 12, de 2 de janeiro de 2001, Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

Macroscópicas:

Ausência de insetos, larvas, parasitos e de todo e qualquer sujidade que indique contaminação do produto.

Organolépticas:

Aspecto do Produto:	Folhas íntegras.
Sabor:	Característico.
Cor do Produto:	Verde.
Odor do Produto:	Característico.

Prazo de Validade

De 24 a 36 meses, dependendo do fornecedor.

Embalagem

Embalagem : sacos de papel Kraft.

Identificação

Em cada embalagem deverá conter as seguintes informações: Nome do produto, Data de fabricação, Data de validade, lote, registro do produtor (CNPJ), peso líquido e ingredientes (quando se tratar de formulação).

Transporte

O produto deve ser transportado em veículos limpos, secos, livres de insetos, larvas e mercadorias que possam vir a gerar contaminação ao produto.

Armazenamento

Armazenar em local fresco, arejado e seco, distante produtos químicos e livres de insetos, pássaros, pombos ou outros.

ANEXO 2

	Especificação Técnica Alecrim Folhas	ET - 67
		Revisão: 03
		Data 1ª Edição: 05/01/09
		Revisado em: 13/09/2010

Produto Nome Científico

ALECRIM FOLHAS/ ROSMANIMUS OFFICINALIS

Descrição: Alecrim seco procedente de espécimes vegetais genuínos, são e limpos.

Propriedades:**Físico-Químicas:**

Umidade: máx. 12% (g/100g)

Microbiológica:

Padrões ANVISA, segundo Resolução RDC 12 de 02/01/2001.

Coliformes a 45°C: máximo 5×10^2 NMP/g

Salmonella sp : ausência em 25 g

Macroscópicas:

Ausência de insetos, larvas, parasitos e de todo e qualquer sujidade que indique contaminação do produto.

Organolépticas:

Aspecto do Produto:	Folhas íntegras e isentas de matérias estranhas
Sabor:	Característico, aromático
Cor do Produto:	Marrom esverdeado
Odor do Produto:	Aromático característico, sem presença de mofo, bolor ou odores estranhos

Prazo de Validade

48 meses da data de fabricação.

Embalagem

Embalagem: sacos de nylon.

Identificação

Em cada embalagem deverá conter as seguintes informações: nome do produto, data de fabricação, data de validade, lote e peso líquido.

Transporte

O produto deve ser transportado em veículos limpossecos, livres de insetos, larvas e mercadorias que possam vir a gerar contaminação ao produto.

Armazenamento

Armazenar em local limpo, seco e arejado, distante de produtos químicos e livres de insetos, pássaros ou outros animais.

Informação Nutricional porção de 0,5g		
Quantidade por porção		%VD*
Valor calórico	0kcal	0
Carboidratos	0g	0
Proteínas	0g	0
Gorduras totais	0g	0
Gorduras saturadas	0g	0
Colesterol	0mg	0
Ferro	0,4mg	4
Sódio	0mg	0
(*) Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.500 calorias.		

ANEXO 3 – Comprovante de Submissão do Artigo

Manuscript submitted to editorial office



Chemical composition and antifungal activity of extracts from the Lamiaceae family facing clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID:	Draft
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Freitaq, Rogério; Federal University of Pelotas, Alves, Gabriela; UFPEL, Blank, Daiane; UFPEL, Marques, Roger; UFPEL, Giordani, Cláudia; UFPEL, Cleff, Marlete; UFPEL,
Keywords:	Rosmarinus, Oriqanum, Lamiaceae, HPLC < Natural Products Analysis, microdilution, Malassezia

SCHOLARONE™
Manuscripts