

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Pythium insidiosum* AO ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia* – RESULTADOS PRELIMINARES

Caroline Quintana Braga¹; Júlia de Souza Silveira²; Anelise de Oliveira da Silva Fonseca³, Carina Perez Schowants⁴, Sônia de Ávila Botton⁵, Daniela Isabel Brayer Pereira⁶

¹ Acadêmica do Curso de Ciências Biológicas- Universidade Federal de Pelotas-RS- carolineqb@hotmai.com

² Mestranda do curso de Parasitologia- Universidade Federal de Pelotas-RS- juliassilveira@gmail.com

³ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia- Universidade Federal de Pelotas-RS- anelise_fonseca@yahoo.com.br

⁴ Acadêmica do Curso de Medicina Veterinária- Universidade Federal de Pelotas-RS- carinaperezmv@gmail.com

⁵ Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria – RS- sabott20@gmail.com

⁶ Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia- Universidade Federal de Pelotas-RS- danielabraye@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um micro-organismo Stramenopila e patógeno para mamíferos. O reino Stramenopila compreende um grande número de organismos autotróficos e heterotróficos de elevada importância ecológica e agrônômica GAULIN et al. (2010). Como um típico oomiceto, *P. insidiosum* habita ecossistemas de água doce e ambientes terrestres e carece de ergosterol em sua membrana citoplasmática GAASTRA et al. (2010). Quando infecta um mamífero causa pitiose, uma doença infecciosa de difícil tratamento e de prognóstico reservado. Entre as espécies mais comumente afetadas estão os equinos, caninos e o homem que habitam áreas pantanosas e alagadas em regiões de clima tropical, subtropical e temperadas. Dependendo da espécie, a enfermidade pode manifestar-se na forma de pitiose cutânea, gastrointestinal, oftálmica ou sistêmica. Diferentes protocolos terapêuticos têm sido empregados para o tratamento da pitiose em animais e no homem. No entanto, os resultados variam consideravelmente GAASTRA et al. (2010). Considerando-se as dificuldades de opções terapêuticas eficazes para a pitiose, muitas pesquisas têm buscado alternativas terapêuticas com agentes antifúngicos e não antifúngicos PEREIRA

et al. (2007); ARGENTA et al. (2012); ZANETTE et al. (2015); JESUS et al. (2014). Dentre estas investigações ressalta-se a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas JESUS et al. (2014); FONSECA et al. (2015a), bem como de compostos extraídos de plantas, incluindo as raízes e frutos SRIPHANA et al. (2013); SUTHIWONG et al. (2014).

O óleo essencial da planta *Melaleuca alternifolia* tem sido alvo de diversas pesquisas em função de suas atividades antibacterianas SAGAVE et al. (2015), antifúngicas FLORES et al. (2013), antivirais MINAMI et al. (2003), antiprotazoárias BALDISSERA et al. (2014) e anti-inflamatórias PEARCE et al. (2005). O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *M. alternifolia* frente ao oomiceto patógeno *P. insidiosum*.

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados 10 isolados de *P. insidiosum* oriundos de animais naturalmente infectados. Todas as amostras foram caracterizadas por métodos morfológicos e moleculares.

O óleo essencial de *M. alternifolia* foi obtido comercialmente de Laszlo Aromaterapia Ltda, Belo Horizonte, Brasil e os componentes do óleo essencial foram previamente determinados pelo fabricante. O inóculo utilizado no teste de suscetibilidade foi preparado a partir de cultura micelial (hifas) de *P. insidiosum*, como previamente descrito por Fonseca et al. (2014b).

Para a realização do teste de suscetibilidade empregou-se o método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M-38A2 do CLSI com modificações para fitofármacos. As concentrações do óleo essencial de *M. alternifolia* testadas variaram de 8,5 mg/mL a 0,02 mg/mL. Em cada poço da placa de microdiluição foi adicionado 100µL de cada diluição e adicionado igual volume de inóculo. Para cada um dos isolados de *P. insidiosum* foi estabelecido um controle positivo (100µL de RPMI e 100µL de inóculo) e um controle negativo (100µL de RPMI e 100 µL da diluição do óleo). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40 rpm, durante 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A leitura dos resultados foi realizada em 48 horas de incubação e considerou o crescimento visual ou não de hifas. A menor concentração do óleo

essencial capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* em relação ao controle positivo foi identificada como a concentração inibitória mínima (CIM). A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada pela transferência de uma alíquota de 100µL das concentrações do óleo essencial iguais ou maiores ao estabelecido na CIM, para tubos de ensaio contendo 900µL de caldo Sabouraud. Após 48h de incubação a 37°C, a menor concentração do óleo essencial que não evidenciou crescimento foi considerada como a CFM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A composição do óleo essencial de *M. alternifolia* empregado no presente estudo constituiu-se de: terpinen-4-ol (40-52%), Y-terpineno (6-20%), α-terpineno (11-16%), 1,8 cineol (1-2%), terpineol (5%), limoneno (3-4%), pineno (3-5%) e terpinoleno (1-5%), conforme informado pelo fabricante. O potencial antimicrobiano de *M. alternifolia* tem sido atribuído aos seus componentes majoritários (terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α terpineol, terpinoleno e α- e Y-terpineno) representando cerca de 90% da estrutura do óleo de *M. alternifolia* BROPHY et al. (1989). Esta composição estava presente no óleo essencial utilizado neste estudo. Verificou-se que os valores da CIM frente aos 10 isolados de *P. insidiosum* avaliados foram: 2,13 mg/mL (n=1; 10%); 1,06 mg/mL (n=6, 60%) e 0,53 mg/mL (n=3, 30%). Adicionalmente, a CIM capaz de inibir 90% dos isolados avaliados (CIM90) foi de 1,06 mg/mL. Observou-se que as concentrações fungicidas mínimas foram iguais a concentração inibitória mínima para a maioria dos isolados testados. Apenas um isolados apresentou CFM 4 vezes maior do que a CIM.

P. insidiosum é um micro-organismo que compartilha muitas características com os fungos verdadeiros. No entanto, a ausência de ergosterol na membrana citoplasmática o torna não responsivo a maioria dos antifúngicos disponíveis. No presente estudo, os resultados obtidos evidenciaram que o óleo essencial de *M. alternifolia* apresentou atividade antimicrobiana frente aos isolados de *P. insidiosum* avaliados.

Estudos prévios *in vitro* que avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas JESUS et al. (2014); FONSECA et al. (2015a), bem como de compostos extraídos de plantas, incluindo raízes e frutos SHRIPHANA et al. (2013); SUTHIWONG et al. (2014) têm relatado resultados animadores e promissores

frente a *P. insidiosum*. Adicionalmente, um estudo *in vivo* evidenciou a atividade da combinação de uma formulação tópica de *Origanum vulgare* e *Mentha piperita* associada a imunoterapia no tratamento da pitiose cutânea experimental FONSECA et al. (2015c). Embora os resultados aqui apresentados sejam preliminares, pesquisas têm evidenciado a ação antimicrobiana da *M. alternifolia* sobre fungos FLORES et al. (2013), bactérias SAGAVE et al. (2015), vírus MINAMI et al. (2003) e parasitos BALDISSERA et al. (2014).

Pesquisas empregando óleos essenciais de plantas como alternativas de tratamento em diferentes enfermidades têm aumentado nos últimos anos. Estes compostos apresentam como vantagens a baixa toxicidade às células dos mamíferos, menor impacto ambiental e boa aceitação pelos consumidores FONSECA et al. (2015a).

4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares obtidos no presente estudo sugerem que o óleo essencial de *M. alternifolia* pode constituir-se numa terapia adicional ao tratamento da pitiose. No entanto, outros estudos, utilizando um maior número de isolados, bem como a realização de experimentos para avaliar a ação de *M. alternifolia in vivo*, são necessários para verificar sua aplicabilidade em pitiose clínica.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARGENT, J.S.; ALVES, S.H.; SILVEIRA, F.; MABONI, G.; ZANETTE, R.A.; CAVALHEIRO, A.S.; PEREIRA, P.L.; PEREIRA, D.I.B.; SALLIS, E.S.V.; PÖTTER, L.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Vet. Microbiol**, 157: 137–142, 2012.

BALDISSERA, M.D.; SILVA, A.S.; OLIVEIRA, C.B.A.; SANTOS, R.C.V.; RODRIGO, A.; VAUCHER, R.A.; RAFFIN, R.P.; GOMES, P.; DAMBROS, M.G.C.; MILETTI, L.C.; BOLIGON, A.A.; ATHAYDE, M.L.; MONTEIRO, S.G. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Exp Parasitol**, 141,21–27, 2014.

BROPHY, J.J.; DAVIES, N.W.; SOUTHWELL, I.A.; STIFF, I.A.; WILLIAMS L.R. Gaschromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). **J Agric and Food Chem**, 37,1330-5, 1989.

FONSECA, A.O.F.; PEREIRA, D.I.B.; JACOB, R.G.; MAIA FILHO, F.S.; OLIVEIRA, D.H.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.S.; OSÓRIO, L.G.; BOTTON, S.A.; MEIRELES, M.C.A. *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some *Lamiaceae* family species. **Mycophatogia**, 179, 253-8, 2014a.

FONSECA, A.O.F.; PEREIRA, D.I.B.; MAIA FILHO, F.S.; OSÓRIO, L.G.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.S.; PÖTTER, L.; MEIRELES, M.C.A. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **J Antimicrob Chemother**. 69,1564-7, 2014b.

FONSECA, A.O.F.; PEREIRA, D.I.B.; BOTTON, S.A.; PÖTTER, L.; SALLIS, E.S.V.; JÚNIOR, S.F.V.; MAIA FILHO, F.S.; ZAMBRANO, C.G.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.S.; BAPTISTA, C.T.; Braga C.Q.; DAL BEM, V.; MEIRELES, M.C.A. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Vet Microbiol**, 5,265-9, 2015c.

FLORES, F.C.; LIMA, J.A.; RIBEIRO, R.F.; ALVES, S.H.; ROLIM, C.M.B.; BECK, R.C.R.; SILVA, C.B. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**, 175,281–6, 2013.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L. J. A.; DE COCK, A.W.A.M.; EXEL, T.K.; PEGGE, R. B.G.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: An overview. **Vet Microbiol**, 146,1-16, 2010.

GAULIN, E., BOTTIN, A., DUMAS, B. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. **Plant Signal Behav**, 5, 258–260, 2010.

JESUS, F.P.; FERREIRO, L.; BIZZI, K.S.; LORETO, E.S.; PILOTTO, M.B.; LUDWING, A.; ALVES, S.H.; ZANETTE, R.A.; SANTURIO, J.M. *In vitro* activity of

carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **J Mycol Méd**, 25,89-93, 2014.

MINAMI, M.; KITA, M.; NAKAYA, T.; YAMAMOTO, T.; KURIYAMA, H.; IMANISHI, J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. **Microbiol Immunol**, 47,681-684, 2003.

SAGAVE, L.; GRESSLER, L.T.; FLORES, F.C.; SILVA, C.B.; VARGAS, A.P.C.; LOVATO, M.; SANGIONI, L.A.; PÖTTER, L.; BOTTON, S.A. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arq Bras Med Vet Zootec**, 67,221-6, 2015.

SRIPHANA, U., THONGSRI, Y., ARDWICHAI, P., POOPASIT, K., PRARIYACHATIGUL, C., SIMASATHIANSOPHON, S., YENJAI, C. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**, 91, 39–43, 2013.

SUTHIWONG, J.; SRIPHANA, U.; THONGSRI, Y.; PROMSUWAN, P.; PRARIYCHATIGUL, C.; YENJAI, C. Coumarinoid from the fruits of *Micromelum facatum*. **Fitoterapia**, 94,134-41, 2014.

ZANETTE, R.A., JESUS, F.P.K., PILOTTO, M.B., WEIBLEN, C., PÖTTER, L., FERREIRO, L., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. **J. Mycol. Med.**, 25, 91-94, 2015.

PEREIRA, D.I.B.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. et al. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **J Antimicrob Chemother**, 60,1168 –71, 2007.

PEARCE, A.L.; FINLAY-JONES, J. J.; HART, P.H. Reduction of nickelinduced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. **Inflamm res**, 54,22-30, 2005.