

ATIVIDADE *IN VITRO* DE TERBINAFINA ASSOCIADA A ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE O OOMICETO AQUÁTICO *Pythium insidiosum*

BÁRBARA GREGORY CUNHA¹; JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE²; THAÍS
ESTÉRCIO³; CAROLINA LITCHINA BRASIL⁴; SÔNIA DE ÁVILA BOTTON⁵;
DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – barbara_cunha13@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – juliassilveira@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – thayseloiza@gmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas – carolinalitchinabrasil@hotmail.com

⁵Universidade Federal de Santa Maria – sabott20@gmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático, classificado no reino Stramenopila, filo Oomycota, família Pythiaceae, gênero *Pythium*. Essa espécie é conhecida como principal patógena para mamíferos, uma vez que causa pitiose, uma doença crônica, que acomete animais e humanos, tendo sido descrita nas Américas, em alguns países europeus e sudeste asiático (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; MENDOZA et al., 1996).

O tratamento de infecções causadas por esse agente em animais e humanos é dificultado por suas características, sobretudo na formação de membrana citoplasmática. Essa, não contém como principal esteróide o ergosterol, que é o componente-alvo de ação da maioria das drogas antifúngicas. Devido a isso, as drogas antifúngicas disponíveis possuem baixa ação contra esse patógeno (FOIL, 1996; MENDOZA et al. 1996).

A terbinafina é um antifúngico pertencente ao grupo das alaminas o qual atua em uma etapa precursora à biossíntese do ergosterol. Estudos *in vitro* relatam baixa atividade anti-*Pythium insidiosum* quando em monoterapia (FONSECA et al., 2014). Todavia, pesquisas têm demonstrado sinergismo quando associada a outros antimicrobianos (CAVALHEIRO et al., 2009; ARGENTA et al., 2012; PEREIRA et al., 2007).

Os óleos essenciais são uma nova linha de pesquisa que vem surgindo no tratamento da pitiose. Estudos anteriores comprovam a ação de óleos essenciais *in vitro* e *in vivo* sobre esse patógeno, demonstrando uma boa eficácia (FONSECA et al., 2015; VALENTE et al., 2016).

Diante dos fatos, o objetivo deste trabalho foi testar a suscetibilidade *in vitro* deste oomiceto em questão, frente às combinações de terbinafina com os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*.

2. METODOLOGIA

As combinações *in vitro* foram avaliadas usando o método de *checkerboard* para microdiluição frente a 19 isolados clínicos de *P. insidiosum* e uma cepa padrão (CBS 101555). Todos os isolados foram caracterizados por suas características morfológicas e moleculares descritos por AZEVEDO et al. (2012).

Para cada composto foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), sendo a mais baixa concentração capaz de inibir *P. insidiosum*.

Os testes foram realizados conforme o protocolo M38-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e as interpretações das combinações foram

baseadas nos valores do Índice de Fração Inibitória Mínima (FICI) o qual classifica as combinações como sinérgica ($FICI \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < FICI \leq 4$) ou antagonista ($FICI > 4$) utilizando a fórmula $FICI = (MIC\ A\ na\ combinação / MIC\ A\ isolado) + (MIC\ B\ na\ combinação / MIC\ B\ isolado)$, onde MIC A e MIC B indicam o MIC de cada óleo essencial avaliado (JOHNSON, 2004).

O inóculo para os testes de suscetibilidade empregou cultura micelial de *P. insidiosum*, diluído 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS (ácido morfolínico propanosulfônico).

Os compostos avaliados no presente estudo incluíram terbinafina (TER, 128 – 0,25µg/mL) (ASKY, Ltda, São Bernardo do Campo-SP, Brasil) e os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (MA 14.000-25µg/mL) (Laszlo Aromaterapia Ltda, Belo Horizonte, Brasil), *Mentha piperita* (MP, 14.000 - 25 µg/mL) e *Origanum vulgare* (OV, 14.000 - 25µg/mL) (Ferquima Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil). Os componentes dos óleos essenciais foram fornecidos pelo fabricante.

As combinações de TER+MA, TER+MP e TER+OV foram avaliadas empregando o método de *cherkerboard* para microdiluição. Para todos os testes foi utilizado controle positivo (inóculo + RPMI) e negativo (extrato de óleo + antifúngico + RPMI). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40 rpm, durante 48 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes simples, evidenciou-se atividade antimicrobiana da terbinafina com concentrações inibitórias mínimas que variaram entre 4 e 16µg/mL e CIM₅₀ e CIM₉₀ de 8µg/mL e 16µg/mL, respectivamente. Observou-se que *O. vulgare* apresentou os menores valores de CIM (50 -1750µg/mL) com CIM₅₀ e CIM₉₀ de 220 e 870µg/mL, na devida ordem.

Quando avaliadas as combinações de terbinafina com os óleos essenciais, verificou-se que o efeito sinérgico não ocorreu em nenhuma das combinações. No entanto, indiferença foi observada em 100% (20/20), 90% (18/20) e 85% (17/20) das combinações de terbinafina com *M. alternifolia*, *M. piperita*, e *O. vulgare*, respectivamente. Efeito antagônico foi evidenciado nas combinações com *M. piperita* 10% (2/20) e *O. vulgare* 15% (3/20). Esses resultados foram discrepantes aos relatados por JESUS et al. (2015), os quais obtiveram 48% e 32% de efeito sinérgico nas combinações de terbinafina com timol e carvacrol. Infere-se que essas diferenças encontradas podem ser atribuídas às particularidades dos compostos bioativos presentes nas substâncias empregadas neste estudo. Contudo, Cavalheiro et al. (2009) constatou altos índices de indiferença ou antagonismo ao combinar terbinafina com outras classes de antimicrobianos, o que corrobora com nossos achados.

Foram evidenciadas diminuição das CIM da terbinafina em 85% (17/20), 55% (11/20) e 75% (15/20) das amostras quando combinada com *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* respectivamente. Essa observação demonstra benefícios no uso da combinação desse fármaco com os óleos essenciais, uma vez que melhora a eficácia do mesmo no combate a *P. insidiosum* quando comparado ao seu uso isolado. Segundo Zhu, Gil-Lamaignere e Müller (2004) a associação de dois compostos pode aumentar a taxa de morte microbiana e encurtar a duração do tratamento, bem como permitir o uso de doses mais baixas de cada composto, reduzindo os efeitos tóxicos dos mesmos.

Ressalta-se que a terbinafina atua em uma etapa precursora a da síntese do ergosterol, pois ela age sobre a enzima esqualeno-epoxidase, causando assim,

deficiência de ergosterol na membrana e acúmulo intracelular de esqualeno, levando à toxicidade da célula (COSTA; GORNIK, 2002). Apesar desse agente não possuir o ergosterol de membrana, é relatado que outros oomicetos possuem outras vias de biossíntese de esteróis (GRIFFITH; DAVIS; GRANT, 1992).

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre devido às alterações na integridade da membrana citoplasmática, prejudicando o metabolismo celular. Acredita-se que este mecanismo poderia auxiliar a ação dos antifúngicos sobre *P. insidiosum* e, em parte, explicaria os resultados obtidos nessa pesquisa.

4. CONCLUSÕES

Através deste estudo, analisa-se que a associação dos óleos essenciais com a terbinafina pode trazer resultados positivos no combate a *P. insidiosum*, uma vez que possibilita o uso de menores concentrações nas dosagens de cada composto, podendo aumentar também a eficácia na eliminação desse agente. No entanto, é necessária a avaliação terapêutica desse tipo de combinação, sendo uma possível alternativa promissora na busca de novos protocolos terapêuticos para o tratamento da pitiose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALEXOPOULOS, C.J., MIMS, C.W., BLACKWELL, M., Phylum Oomycota. In: **Introductory mycology**. New York: John Wiley & Sons, 1996. 4.ed. Chap.23, p.683-737.

ARGENTA, J.S., ALVES, S.H., SILVEIRA, F., MABONI, G., ZANETTE, R.A., CAVALHEIRO, A.S., PEREIRA, P.L., PEREIRA, D.I., SALLIS, E.S., POTTER, 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*. **Veterinary Microbiology**. v.157, n. 1-2, p.137-142, 2012.

AZEVEDO, M.I., PEREIRA, D.I.B., BOTTON, A.S., COSTA, M.M., MAHL, C.D., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M.. *Pythium insidiosum*: morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.32, n.7, p. 619-22, 2012.

CAVALHEIRO A.S., ZANETTE RA, SPADER, T.B., LOVATO, L., AZEVEDO, M.I., BOTTON, S., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M.. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, n.3-4, p.408-411, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. And ed. Wayne: M38-A2 CLSI, p.144, 2008.

COSTA, E.O., GORNIK, S.L. . Agentes antifúngicos e antivirais. In: Spinosa HS, Gornik SL Bernardi M. M. eds. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.431-442.

FOIL, C.S. Update on pythiosis (Oomycosis). In: **THE NORTH AMERICAN VETERINARY CONFERENCE**, 1996, Orlando. **Proceedings...** Orlando : Bayer Animal Health, 1996. p.57-63.

FONSECA, A.O., PEREIRA, D.I., BOTTON, S.A., PÖTTER, L., SALLIS, E.S., JÚNIOR, S.F., FILHO, F.S., ZAMBRANO, C.G., MARONEZE, B.P., VALENTE, J.S., BAPTISTA, C.T., BRAGA, C.Q., DAL-BEM, V., MEIRELES, M.C. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. **Veterinary Microbiology**. v.178, n.3-4, p. 178:265-9, 2015.

GRIFFITH, J.M., DAVIS, A.J., GRANT, B.R. . Target sites of fungicides to control Oomycetes, p.69-99. In: W. Koeller ed. **Target sites of fungicide action**. CRC, Boca Raton, FL, 1992; p.328.

JESUS, F.P., FERREIRO, L., BIZZI, K.S., LORETO, E.S., PILOTTO, M.B., LUDWIG, 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*. **Journal de Mycologie Médicale**. v.25, n.2, p. 89-93, 2015.

JOHNSON, M.D., MCDOUGALL, C., OSTROSKY-ZEICHNER, L., PERFECT, J.R., REX, J.H. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**.;v.48, n.3, p.693-15, 2004.

MENDOZA, L., AJELLO L., MCGINNIS M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.6, n.4, p.151-164, 1996.

PEREIRA, D.I.B., SANTURIO, J.M., ALVES, S.H., ARGENTA, J.S., POTTER, L., SPANAMBERG A, F. L. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial and Chemotherapy**, v.60, n.5, p 1168–71, 2007.

VALENTE J.S.S., FONSECA A.O.S., DENARDI L.B., DAL BEN V.S., MAIA FILHO F.S., BAPTISTA C.T., BRAGA C.Q., ZAMBRANO C.G., ALVES S.H, BOTTON S.A., PEREIRA DIB. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. **Mycopathologia**.v.181, n.5-6, 2016.

ZHU L, GIL-LAMAGNERE C, MÜLLER FC. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**, v.47, n.7, p.319-25, 2004.