

EFEITO SINÉRGICO NA ASSOCIAÇÃO ENTRE ANTIFÚNGICO E ÓLEO ESSENCIAL SOBRE CEPAS DE *Pythium insidiosum*

CARINA PEREZ SCHOWANTZ¹; JULIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE²;
NIEVERSON VICENTIN PERSIO³; CAROLINA LITCHINA BRASIL⁴; SÔNIA DE
ÁVILA BOTTON⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas 1 – carinaperezmv@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas- juliassilveira@gmail.com

³ Universidade Federal de Pelotas – nieversonp79@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – carolinallitchinabrasil@hotmail.com

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

⁶ Universidade Federal de Pelotas – danielabraye@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é a principal espécie responsável por causar a pitiose. Essa doença é de rápida evolução e difícil tratamento, sendo endêmica em regiões alagadiças, acometendo caninos, bovinos, ovinos, principalmente equinos e humanos (GAASTRA et al., 2010).

Este micro-organismo é classificado como um pseudo-fungo, sendo responsável por causar lesões cutâneas características. Sua composição torna a terapia antifúngica convencional não satisfatória (GROOTERS, 2003).

Inúmeros são os estudos no que diz respeito ao desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, com distintos mecanismos de ação que possibilitem um prognóstico favorável à pitiose. O itraconazol é um antifúngico do grupo dos azóis, o qual tem sido frequentemente utilizado no tratamento da pitiose em indivíduos doentes, porém com resultados variáveis (DYSTRA et al., 1999; GROOTERS, 2003; PEREIRA et al., 2013).

A utilização de óleos essenciais é descrita com importante aplicabilidade clínica, isso se deve ao fato de que os óleos essenciais possuem propriedades terapêuticas importantes. A importância do óleo essencial de *Mentha piperita* no tratamento da pitiose já é descrita por Fonseca, et. al. (2014a). Por outro lado, estudos avaliando as associações ou combinações de agentes antimicrobianos em testes de suscetibilidade *in vitro* frente a *P. insidiosum* têm evidenciado a ocorrência de interações sinérgicas entre os agentes antimicrobianos testados (ARGENTA et al., 2012; ZANETTE et al., 2015; VALENTE et al., 2016).

Dessa forma, o objetivo deste trabalho é avaliar a interação *in vitro* de itraconazol com óleo essencial de *M. piperita* sobre cepas de *P. insidiosum*.

2. METODOLOGIA

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados empregando-se 19 isolados de *P. insidiosum*, oriundos de animais naturalmente infectados, do estado do Rio Grande do Sul, Brasil e uma cepa padrão (CBS 101555), cedida pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria. Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Micologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPEL). A identificação foi realizada pelas características macro e micro-morfológicas e confirmadas molecularmente conforme descrito por Azevedo et al. (2012). Como inóculo utilizou-se raspado de hifas previamente descrito por Fonseca et al. (2014b).

O óleo essencial utilizado neste estudo foi obtido da Ferquima Indústria e Comércio Ltda, São Paulo-SP, Brasil. O mesmo teve seus componentes determinados pelo fabricante.

As concentrações testadas foram de 256 – 0,5 µg/mL para o itraconazol e de 1400-110 µg/mL para *M. piperita*. A avaliação das associações foi realizada através da técnica de *cherkerboard* conforme protocolo do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). O teste de suscetibilidade empregou o método de microdiluição em caldo, seguindo o protocolo M38-A2 do CLSI (2008), adaptado para testes com fitofármacos. Baseado no Índice de Fração Inibitória Mínima (FICI), as combinações foram interpretadas como sinérgica ($FICI \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < FICI \leq 4$) ou antagonista ($FICI > 4$) (JOHNSON et al., 2004), utilizando a fórmula $FICI = (CIM\ A\ na\ combinação / CIM\ A\ isolado) + (CIM\ B\ na\ combinação / CIM\ B\ isolado)$, onde CIM A e CIM B indicam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada composto avaliado.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A busca por uma terapêutica eficaz para pitiose é de extrema importância, por se tratar de uma doença fatal, de alta ocorrência.

Como resultado dos testes isolados de cada antimicrobiano, observou-se que itraconazol apresentou com valores de CIM (>64) com CIM₅₀ e CIM₉₀ de 64 e 128 respectivamente e *M. piperita* com valores de CIM (110-1750 µg/mL), sendo CIM₅₀ e CIM₉₀ de 445 e 3500 µg/mL. Os valores de CIM obtidos no teste com itraconazol foram semelhantes aos obtidos por Fonseca et al. (2014b). Similarmente, os valores de inibição obtidos para *M. piperita* corroboram com os achados de Fonseca et al. (2014a) e Valente et al. (2016).

A combinação de itraconazol com o óleo essencial de *M. piperita* evidenciou sinergismo em 80% (16/20) das amostras. Esses valores são próximos aos encontrados por Jesus et al. 2015 ao combinar itraconazol com carvacrol ou timol no combate a *P. insidiosum*.

Adicionalmente, observou-se que as CIM das combinações apresentaram valores menores que as CIM isoladas. Quatro combinações apresentaram efeito indiferente e nenhuma das combinações apresentou efeito antagonico.

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais ocorre devido às alterações na integridade da membrana citoplasmática, o que altera a entrada e saída de íons e consequentemente interfere na respiração celular (DORMAN; DEANS, 2000).

Acredita-se que este mecanismo auxilie na ação do itraconazol, que atua, assim como outros azoles, inibindo a síntese de ergosterol na membrana fúngica, comprometendo o metabolismo celular e o desenvolvimento de micro-organismos, o que explicaria a eficácia da sinergia apresentado no presente estudo. Mesmo que o *P. insidiosum* não apresente ergosterol na sua membrana, outras vias de biossíntese de esteróis, em oomicetos foram relatadas por Gaulin (2010), o que pode estar relacionado com a eficácia do itraconazol nos estudos de suscetibilidade *in vitro* com o *P. insidiosum*.

Segundo Zhu et al. 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.

De acordo com os resultados desse estudo, fica evidente o benefício da combinação de itraconazol com o óleo essencial de *M. piperita*, destacando-se que a interação sinérgica desses compostos pode apresentar benefícios no controle da pitiose.

4. CONCLUSÕES

A combinação de itraconazol e óleo essencial de *M. piperita* apresentou atividade antimicrobiana com efeitos sinérgicos, permitindo sugerir como terapêutica efetiva no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. No entanto, outras pesquisas são imprescindíveis na aplicação desse tipo de combinação em indivíduos com pitiose.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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., 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*. **Veterinary. Microbiology**.v.157, n.1-2, p.137-142, 2012.

AZEVEDO, M.I., PEREIRA, D.I.B., BOTTON, A.S., DA COSTA, M.M., MAHL, C.D., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M. *Pythium insidiosum*: Morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira** 2012; v.32 p.619-622

Clinical Laboratory Standarts Institute (CLSI), 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, second edition, CLSI Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standarts Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, ISBN: 1-56238-668-9.

DORMAN, H.J.D; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Applied Microbiology**, v.88, n.22, p.308-316, 2000.

DYKSTRA, M.J., SHARP, N.J., OLIVRY, T., HILLIER, A., MURPHY, K.M., KAUFMAN, L., KUNKLE, G.A., PUCHEU-HASTON, C. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**. v. 37, n. 6, p. 427-433, 1999.

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* supcessibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of

Some *Lamiaceae* family species. **Mycopathologia**, v.179, n.3-4, p. 253-258, 2014a.

FONSECA, A.O.S., 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. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 69, n.6, p.1564-1567, 2014b.

GAASTRA, W., LIPMAN, L.J., DE COCK, A.W., EXEL, T.K., PEGGE, R.B., SCHEURWATER, J., VILELA, R., MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, n. (1-2), p. 1-16, 2010.

GAULIN, E; BOTTIN, A; DUMAS, B; Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. **Plant Signaling & Behavior** v.5,n.3, p. 258-60, 2010.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, n.4, p. 695-720, 2003.

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

PEREIRA, D.I.B., BOTTON, S.A., AZEVEDO, M.I., MOTTA, M.A., LOBO, R.R., SOARES, M.P., FONSECA, A.O., JESUS, F.P., ALVES, S.H., SANTURIO, J.M. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 176, n3-4, p. 309-315, 2013.

ZANETTE, R.A; JESUS, F.P; 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*. **Journal de Mycologie Médicale**.; v.25, n.1, p. 91-94, 2015.

ZHU L, GIL-LAMAINIERE 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.

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.