

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DA COMBINAÇÃO ENTRE OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Mentha piperita* E *Origanum vulgare* FRENTE A *Pythium insidiosum*

JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE¹; ANELISE OLIVEIRA FONSECA²;
CAROLINE QUINTANA BRAGA³; CAROLINE LITCHINA BRASIL⁴; SÔNIA DE ÁVILA BOTTON⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas – juliassilveira@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – anelise_fonseca@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.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 importante oomiceto patógeno de mamíferos, principalmente equinos, caninos e o homem. Causa a pitiose, uma doença grave, de rápida evolução e difícil tratamento, endêmica em regiões de clima quente (GAASTRA et al., 2010).

Os oomicetos são micro-organismos stramenopilas que compartilham várias características morfológicas com os fungos verdadeiros. No entanto, algumas particularidades estruturais os diferenciam dos fungos, particularmente a ausência de ergosterol na composição da membrana citoplasmática e presença de traços de celulose na parede celular. Tais características dificultam a ação dos fármacos antifúngicos convencionais, limitando o tratamento da pitiose, uma vez que a maioria desses medicamentos apresentam como sítio-alvo, o ergosterol na membrana. Dessa forma, a maioria dos animais acometidos pela enfermidade não sobrevivem em decorrência do avanço da infecção (GAASTRA, 2010).

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 dos óleos essenciais no tratamento da pitiose é descrita por Fonseca, et. al. (2014). Por outro lado, combinações de agentes antimicrobianos e compostos bioativos de plantas têm evidenciado a ocorrência de interações sinérgicas em testes de suscetibilidade *in vitro* frente a *P. insidiosum* (JESUS et al, 2015). Contudo, ainda não foram estudadas as interações desses compostos entre si. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *P. insidiosum* frente à combinação dos óleos essenciais de *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*.

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). A identificação foi realizada pelas características macro e micro-morfológicas e confirmada por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento de DNA, conforme descrito por Azevedo et al. (2012). Como inóculo utilizou-se raspado de hifas diluído em RPMI na concentração 1:9.

Os óleos essenciais utilizados neste estudo foram obtidos da Ferquima Indústria e Comércio Ltda, São Paulo-SP, Brasil. Os componentes dos óleos

essenciais foram determinados pelo fabricante. As concentrações testadas foram de 1400-110 µg/mL para cada óleo. A avaliação das combinações 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 ($0,5 < FICI \geq 4$) ou antagonista ($FICI > 4$) (JOHNSON et al., 2004), utilizando a fórmula $FICI = (\text{CIM A na combinação}/\text{CIM A isolado}) + (\text{CIM B na combinação}/\text{CIM B isolado})$, onde CIM A e CIM B indicam a Concentração Inibitória Mínima (CIM) de cada óleo essencial avaliado.

No experimento *in vivo*, todos os animais foram inoculados subcutaneamente na região costal direita com 1 mL de meio de indução contendo aproximadamente 20.000 zoósporos viáveis de *P. insidiosum* (CBS 101555), conforme descrito por Pereira et al. (2007). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob condições apropriadas de higiene, luz e temperatura, recebendo água *ad libitum* e alimentos de acordo com o peso corporal. Diariamente as lesões foram inspecionadas e a evolução das lesões foi medida a cada cinco dias, no sentido horizontal e transversal (cm²), com auxílio de paquímetro.

A pitiose foi reproduzida em seis coelhos do sexo feminino, 90 dias de idade, raça Nova Zelândia. Os animais foram divididos em dois grupos ($n = 3$): grupo 1 (controle-creme base não iônica); grupo 2 (tratado com combinação de *M. piperita* e *O. vulgare*). Ambos foram tratados diariamente por administração tópica de creme contendo os óleos essenciais (grupo 1) ou creme base não iônica (controle) na superfície das lesões, durante 45 dias.

Ao final do experimento, os animais foram submetidos à necropsia, e fragmentos de lesões subcutâneas foram coletadas, fixados em formalina a 10%, rotineiramente processados para análise histopatológica e submetidos à coloração de Hematoxilina-eosina e Grocott. Os dados das medidas das lesões foram submetidos a testes de normalidade e homocedasticidade após o processamento. Quando estes pressupostos foram satisfatórios, uma análise de variância e teste F foram realizados utilizando um nível de significância de 5%.

Todos os procedimentos com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Pelotas (Universidade Federal de Pelotas), com o número de protocolo de 0475.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes *in vitro*, os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*. Dentre eles, observou-se que o óleo de *O. vulgare* apresentou melhor atividade antimicrobiana com faixas de CIM que variaram de 50 µg/mL a 1750 µg/mL, concentração inibitória capaz de inibir 50% dos isolados testados (CIM₅₀) de 220 µg/mL e CIM₉₀ (inibição de 90% dos isolados) de 870 µg/mL. Adicionalmente, *M. piperita* apresentou faixas de CIM que variaram de 531,5 a 2125 µg/mL sendo seu CIM₅₀ e CIM₉₀, 1062,5 e 2125 µg/mL, respectivamente de. Esses resultados foram similares aos observados por Fonseca et al. (2014).

A combinação dos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare* nos testes *in vitro* evidenciaram sinergismo em 65% (13/20) isolados de *P. insidiosum* e indiferença em 35% (7/20). Tais efeitos sinérgicos são comparáveis aos obtidos

por JESUS et al. (2015) ao combinar carvacrol e timol (compostos bioativos de plantas) com antimicrobianos.

Os óleos essenciais atuam na membrana citoplasmática da célula microbiana, causando uma desestabilização da mesma. Dessa forma, causam prejuízos aos processos básicos do metabolismo ocasionando a morte do micro-organismo (DORMAN; DEANS, 2000). Todavia, as diferenças na composição química dos óleos essenciais podem influenciar a suscetibilidade dos micro-organismos. Desta forma, a atividade antimicrobiana de *O. vulgare* é atribuída à presença de compostos majoritários como carvacrol, tymol, 4-terpineol e linalool. No óleo essencial de *M. piperita* os componentes responsáveis pela sua atividade antimicrobiana são o mentol e a mentona (SOYLU; SOYU, KURT, 2006). Ambos componentes estavam presentes nos compostos avaliados.

Nos testes *in vivo*, os animais inoculados com zoósporos de *P. insidiosum* desenvolveram nódulos subcutâneos 25 dias após a inoculação. O tamanho das lesões variaram de 0,25 cm² a 132,2 cm². Um animal do grupo tratado com combinação de *M. piperita* e *O. vulgare* apresentou cura clínica 20 dias após o início do tratamento. A análise estatística revelou que as lesões dos coelhos do grupo tratado com a associação de óleos essenciais de menta e orégano diferiram do grupo controle ($P<0.05$). Resultados semelhantes foram demonstrados por Mugnaini et al. (2013), ao obter a cura clínica de gatos e de ovinos infectados com *Trichophyton mentagrophytes* e *Microsporum canis*, empregando uma combinação de óleos essenciais.

A análise macroscópica da pitiose experimental revelou lesões subcutâneas multilobuladas, endurecidas, branco-rosadas e bastante vascularizadas. A histopatologia na coloração de Hematoxilina-eosina evidenciou a presença de áreas multifocais a coalescentes de necrose constituídas por infiltrados inflamatórios, predominantemente de polimorfonucleares (eosinófilos). Nas áreas de necrose observaram-se imagens tubuliformes negativas, referentes às hifas de *P. insidiosum*. Na coloração de Grocott, foram visualizadas hifas com paredes espessas, marrons, esparsamente septadas e irregularmente ramificadas, localizadas preferencialmente na periferia das áreas de necrose. Essas características também foram observadas por Mendoza e Newton (2005) em estudo da pitiose experimental.

Os resultados das combinações observadas neste estudo foram, em sua maioria, sinérgicas, sugerindo que há uma interação entre esses compostos. Possivelmente, esta interação possa ter sido ocasionada pela melhor penetração de um óleo quando favorecida pela ação dos compostos do outro óleo na membrana citoplasmática do micro-organismo, ou ainda, pela interação de transporte entre os componentes facilitando o acesso dos óleos à membrana citoplasmática do oomiceto. Todavia estas hipóteses demandam futuros estudos para a sua comprovação.

4. CONCLUSÕES

Este estudo evidencia que isolados de *P. insidiosum* são suscetíveis aos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare* principalmente quando combinados entre si. Além disso, sua combinação apresenta capacidade curativa quando aplicada em animais com pitiose experimental. Esses fatos sugerem que os óleos essenciais e suas combinações representam uma nova proposta de terapia para a pitiose em animais, no entanto, são necessários mais estudos que possibilitem tal aplicação.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**, v.32, n.7 p.619-622, 2012.

Clinical Laboratory Standards 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 Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, ISBN: 1-56238-668-9.

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. **Mycopathologia**, v.179, n.3-4, p. 253-258, 2014.

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.

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.; NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v. 43, p. 477-486, 2005.

Mugnaini, L., Nardoni, S., Pistelli, L., Leonardi, M., Giulietti, L., Benvenuti, M.N., Pisseri, F., Mancianti, F., 2013. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpillum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. **Mycoses**, v.56, n.3, p. 333–337, 2013.

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.

Soylu, E.M., Soylu, S., Kurt, S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Pytophthora infestans*. **Mycopathologia**, v. 161, n.2, p.119-26, 2006.