

## Efeito antimicrobiano de carvacrol sobre isolados clínicos de *Pythium insidiosum*

JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA<sup>1</sup>; CAROLINA LITCHINA BRASIL<sup>2</sup>, CAROLINE QUINTANA BRAGA<sup>3</sup>, VANESSA DAL BEN<sup>4</sup>, SÔNIA DE ÁVILA BOTTON<sup>5</sup>, DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – juliassilveira@gmail.com

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas –carolinalitchinabrasil@hotmail.com

<sup>3</sup>Universidade Federal de Pelotas - carolineqbraga@hotmail.com

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas - nessadalben@hotmail.com

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas -sabott20@gmail.com

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas– danielabrayer@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto encontrado em ecossistemas lênticos, em regiões de clima quente. Seu ciclo biológico desenvolve-se principalmente na zona eufótica desses ambientes, onde são encontradas vegetações rasteiras que servem de substrato para seu desenvolvimento e reprodução assexuada. Esses habitats representam risco para os mamíferos, que se infectam e desenvolvem a enfermidade (pitiose) ao entrar em contato com águas contaminadas pelo micro-organismo (MILLER, 1983; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996).

A pitiose é uma enfermidade grave, de evolução rápida e difícil tratamento. Seu agente etiológico é um pseudo-fungo e, portanto, com peculiaridades em sua constituição estrutural de membrana e parede celular que os diferencia dos fungos verdadeiros. Esses fatos impossibilitam as terapias com antifúngicos convencionais. Essa dificuldade terapêutica impulsiona novas pesquisas que visam um tratamento mais eficaz, buscando princípios ativos que possuam maior afinidade pelos componentes estruturais de *P. insidiosum* (MENDOZA; VILELA, 2013).

Nos últimos anos uma nova linha de pesquisa tem se destacado com resultados bastante promissores no combate a *P. insidiosum*: a fitoterapia. Estudos recentes demonstram que extratos de plantas medicinais possuem ação letal sobre esse micro-organismo e podem representar uma boa alternativa no tratamento da pitiose (FONSECA et al., 2015a,b; VALENTEet al. 2016 a,b,c). Dentre os compostos com propriedades anti- *Pythium* destaca-se o óleo essencial de *Origanum vulgare* o qual demonstrou inibição do oomiceto em baixas concentrações tanto *in vitro* (FONSECA et al., 2015a; VALENTE et al., 2016b,c) como *in vivo* (FONSECA et al., 2015). sugerindo que a ação desse óleo essencial sobre isolados de *P. insidiosum* se deve a presença de carvacrol como componente majoritário. Previamente, JESUS et al. (2014) demonstraram a atividade anti-*Pythium* de carvacrol.

O presente estudo investigou o perfil da suscetibilidade *in vitro* de isolados clínicos de *P. insidiosum* frente ao carvacrol.

### 2. METODOLOGIA

Foram avaliados 29 isolados clínicos de *P. insidiosum* oriundos de equinos naturalmente infectados e uma cepa padrão (CBS 101555). Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de

Pelotas e foram identificados por características macro e micro morfológicas e confirmados molecularmente conforme descrito por AZEVEDO et al. (2012).

O inóculo para os testes de suscetibilidade empregou cultura micelial de *P. insidiosum*, elaborado conforme descrito por FONSECA et al. (2014), diluído 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS.

Os testes de suscetibilidade foram realizados seguindo o protocolo de microdiluição em caldo (M38-A2) do CLSI. O carvacrol foi obtido comercialmente da empresa Sigma-Aldrich Ltda. Para a realização dos testes o carvacrol foi diluído em metanol e testado nas concentrações de 2.800 a 5,47 µg/mL. As amostras foram incubadas sob agitação a 37°C por 48 horas. A leitura foi visual e levou em consideração o crescimento ou não de hifas. A menor concentração do carvacrol capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* foi identificada como Concentração Inibitória Mínima (CIM). As concentrações acima da CIM foram utilizadas para a determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). Para isso 100 µL da diluição foram transferidos para tubos contendo 900 µL de caldo Sabouraud, ficando incubados a 37°C por 48 horas. A menor concentração do princípio ativo que não evidenciou crescimento foi considerada a CFM.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O carvacrol é principal componente majoritário do óleo essencial de *Origanum vulgare*, o qual possui propriedades antimicrobianas bem evidenciadas (HUSAIN et al., 2011). Os testes de suscetibilidade *in vitro* demonstraram que a faixa de CIM do carvacrol variou de 10 a 700 µg/mL. Observou-se que a CIM capaz de inibir 50% (CIM<sub>50</sub>) e 90% (CIM<sub>90</sub>) dos isolados testados foi de 175 µg/mL e 700 µg/mL, respectivamente. As CFM do carvacrol foram iguais às CIM para todos os isolados do oomiceto. Os resultados do presente estudo corroboram os relatados por JESUS et al. (2015), que evidenciaram CIM variando entre 80 a 320 µg/mL ao avaliarem a ação de carvacrol frente a 23 isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

As CIM observadas para o carvacrol foram inferiores as encontradas pelo nosso grupo de pesquisa utilizando o óleo essencial de *Origanum vulgare* (VALENTE et al., 2016c), demonstrando que o carvacrol possui melhor atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*. Segundo RAO et al. (2010), o carvacrol afeta a homeostase dos íons de Ca<sup>2+</sup> e H<sup>+</sup> por interferência na permeabilidade dos canais iônicos. Além disso, esses autores relatam que os constituintes dos óleos essenciais podem interferir na via de sinalização TOR, resultando na perda da viabilidade da célula fúngica.

### 4. CONCLUSÕES

Os resultados observados permitem inferir que o carvacrol possui atividade anti-*Pythium*, portanto pode representar um grande potencial a ser incorporado no tratamento da pitiose. Entretanto, são necessários mais estudos para comprovar sua atividade em indivíduos enfermos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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**. n.32, p.619-22, 2012.

FONSECA et al. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 69, n.6, p.1564-1567, jun. 2014.

FONSECA et al. *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pyhtium insidiosum* isolates to essential oils of some Lamiaceae family species. **Micopathologia**. v.179, n.3-4, p.253-258, . 2015 a.

FONSECA et al. 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.265-269, 2015b.

JESUS F.P. et al. *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, jun. 2015.

MILLER, R. I. Investigations into the biology os three ‘phycomycotic’ agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopatologia**. v.81, p. 23-28, 1983.

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

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mamalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**.v.7, n.3, p.198-208, 2013.

Hussain AI, Anwar F, Rasheed S, Nigam PS, Janneh O, Sarker SD. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.21 p:943-52, 2011.

VALENTE J.S.S., FONSECA, A.O.S., BRASIL, C.L., SAGAVE, L. FLORES, F.C., DA SILVA, C.B., SANGIONI, L.A., PÖTTER, L., SANTURIO, JM., BOTTON, S.A., PEREIRA, D.I.B. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in its free oil and nanoemulsion formulations against *Pythium insidiosum*. **Micopathologia**. v.181, n 11-12, p.:865-869, 2016a.

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. **Micopathologia**.v.181, n.5-6, 2016b.

VALENTE J.S.S., FONSECA, A.O., DENARDI, L.B., MAIA FILHO, F.S., ZAMBRANO, C.G., BRAGA, C.Q., ALVES, S.H., BOTTON, S.A., PEREIRA, D.I.B. et al. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, n.4, p.998-1003, 2016c.