

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Pythium insidiosum* AO ÓLEO ESSENCIAL DO CRAVO (*Eugenia caryophyllata* Thunb.)- RESULTADOS PRELIMINARES

CAROLINE QUINTANA BRAGA¹; JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA²;
VANESSA DAL BEN³; CRISTIANE TELLES BAPTISTA⁴; ISABEL DA ROCHA
ALDRIGHI⁵, DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Universidade Federal de Pelotas-RS- carolineqbraga@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas-RS- juliassilveira@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas- RS - nessadalben@hotmail.com

⁴Universidade Federal de Pelotas- RS - pequenatellesbaptista@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas-RS- rocha-bel@hotmail.com

⁶Universidade Federal de Pelotas-RS- danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático causador da pitiose. A doença acomete mamíferos, principalmente equinos, caninos e humanos, sendo endêmica em regiões alagadiças de clima subtropical. A evolução da enfermidade é rápida e o seu tratamento difícil (GAASTRA et al., 2010).

Morfologicamente é similar aos fungos filamentosos. No entanto, diferente dos fungos verdadeiros, pois carece de ergosterol em sua membrana citoplasmática, principal alvo dos fármacos antifúngicos. Este fato, em parte, justifica a ineficácia dos tratamentos antifúngicos empregados na pitiose em animais e no homem (MENDOZA; VILELA, 2013).

Diferentes protocolos terapêuticos têm sido empregados para o tratamento da pitiose nas espécies afetadas. Contudo, os resultados variam consideravelmente (GAASTRA et al., 2010). Frente a estas dificuldades terapêuticas, nas últimas décadas, vários grupos de pesquisa se engajaram em estudos objetivando avaliar a suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *P. insidiosum* a diferentes princípios ativos, incluindo os óleos essenciais de plantas (JESUS et al., 2015; FONSECA et al., 2015a,b; VALENTE et al., 2016), bem como compostos extraídos de raízes e frutos (SRIPHANA et al., 2013; SUTHIWONG et al., 2014).

Considerando a necessidade de alternativas terapêuticas para pitiose e a atividade antimicrobiana de compostos bioativos de plantas, no presente estudo avaliou-se a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente ao óleo essencial de *Eugenia caripholiatta* (cravo).

2. METODOLOGIA

Neste estudo foram utilizados 10 isolados de *P. insidiosum* oriundos de equinos naturalmente infectados. Todos os isolados foram caracterizados por métodos morfológicos e moleculares. O óleo essencial de *E. caripholiatta* utilizado no estudo foi obtido da Ferquima Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil. O mesmo teve seus componentes 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. (2014c). 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 *E. caripholiatta* testadas variaram de 5.6000 µg/mL a 109,38 µg/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 igual 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

O óleo essencial de *Eugenia caripholiatta* tem como princípio ativo o eugenol, um composto fenólico (4-alil-2-metoxifenol-C₁₀H₁₂O₂) que está presente no caule, flores e folhas da planta (GRIFFITHS, 2000). O eugenol possui atividade antibactericida contra *Streptococcus mutans*, *Bacillus cereus*; antifúngica contra *Aspergillus niger*, *Candida albicans*, , entre outras espécies de fungos, além de possuir efeito anti-inflamatório, cicatrizante e analgésico (DELESPAUL et al., 2000). Neste estudo verificou-se que os valores da CIM frente aos 10 isolados de *P. insidiosum* avaliados foram: 437,5 µg/mL (n=3; 30%); 875 µg/mL (n=7, 70%). Adicionalmente, a CIM capaz de inibir 50% dos isolados avaliados (CIM₅₀) foi de 875 µg/mL. Observou-se que as concentrações fungicidas mínimas foram iguais a concentração inibitória mínima para todos os isolados testados.

A utilização de óleos essenciais e compostos bioativos oriundos de plantas vem ganhando destaque nas pesquisas que buscam alternativas de terapias para o controle da infecção causada por *P. insidiosum* em mamíferos. Jesus et al. (2015) sugeriram que as combinações dos óleos essenciais de carvacrol e timol com agentes antimicrobianos podem se constituir numa alternativa para o tratamento da pitiose cutânea. Similarmente, Fonseca et al., (2015a) demonstraram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *P. insidiosum*. Adicionalmente, um estudo *in vivo* demonstrou a ação 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). Pesquisas de Valente et al., (2016) evidenciam que *P. insidiosum* é suscetível aos óleos essenciais de *M. piperita*, *M. alternifolia* e *O. vulgare* individualmente e nas suas combinações.

O efeito antimicrobiano dos óleos essenciais pode ser atribuído ao seu mecanismo de ação que atua em nível de membrana citoplasmática. A ação dos óleos essenciais sobre a membrana citoplasmática da célula microbiana leva a sua desestabilização, ocasionando prejuízos aos processos do metabolismo e permeabilidade, o que determina a morte do micro-organismo (DORMAN;

DEANS, 2000). Embora os resultados aqui apresentados sejam preliminares, pesquisas têm evidenciado a ação antimicrobiana do *E. caripholiatta* sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni*, *Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes* diminuindo significativamente a taxa de crescimento destes micro-organismos (SCHERER et al., 2009).

Estudos utilizando 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

Este estudo evidencia que os isolados de *P. insidiosum* avaliados são suscetíveis ao óleo essencial de *E. caripholiatta*. Todavia, a suscetibilidade *in vitro* de um maior número de isolados precisa ser testado, bem como é necessário verificar-se a aplicabilidade *in vivo* do emprego desse óleo na pitiose cutânea.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. Veterinary Clinics of North America: **Equine Practice**. V. 11, n. 1, p. 91-103, 1995

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.

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V.G.; ROQUES, C.G.; MICHEL, G.; MARQUIER-VINUALES, C.; BESSIERE, J.M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. Journal of Essential Oil Research, **Carol Stream**. V. 12, n.2, p. 256-266, Mar 2000.

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.

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**, 179, 253-8, 2014a.

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, 2015b.

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, 2014c.

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.

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

GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. **J. Fish Biol.** , London, v. 57, p. 1453-1464, 2000.

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.

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

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. **Rev. Bras. Plantas Med**. 2009, 11, 442.

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.; PRARIYACHATIGUL, C.; YENJAI, C. Coumarinoid from the fruits of *Micromelum facatum*. **Fitoterapia**, 94,134-41, 2014.

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.