

Atividade anti-*Pythium insidiosum* do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e de seu composto majoritário terpineol

GIOVANA MANCILLA PIVATO¹; JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA²; CAROLINE QUINTANA BRAGA³; CRISTIANE TELLES BAPTISTA⁴; CAROLINA LITCHINA BRASIL⁵; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹Faculdade Federal de Pelotas 1 – gimpivato@gmail.com 1

²Faculdade Federal de Pelotas 2 – juliassilveira@gmail.com 2

³Faculdade Federal de Pelotas – carolineqbraga@hotmail.com 3

⁴Faculdade Federal de Pelotas – cris-baptista@outlook.com 4

⁵Faculdade Federal de Pelotas – carolina.litchinabrasil@hotmail.com 5

⁶Faculdade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com 6

1. INTRODUÇÃO

Oomicetos do gênero *Pythium* são micro-organismos termofílicos, ubíquos em ecossistemas de água doce e no solo. *Pythium insidiosum* é um eucarioto Stramenopila de importância ecológica, agronômica e patógeno para mamíferos (GAULIN et al., 2010).

Em seu ciclo biológico, *P. insidiosum* utiliza plantas aquáticas para desenvolvimento e reprodução assexuada que compreende a formação de zoósporos infectantes, que são liberados nas águas e movimentam-se até encontrar outra planta onde completam seu ciclo. Todavia, estes zoósporos também podem ser atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados de mamíferos, onde se fixam e emitem tubos germinativos dando inicio a uma infecção (Miller, 1983).

Quando infecta um mamífero, causa a pitiose, uma doença infecciosa piogranulomatosa de difícil tratamento, de prognóstico reservado e descrita em vários países (Mendoza et al., 1996). No Brasil, esta enfermidade é bem documentada em equinos (Marcolongo-Pereira et al. 2012), bovinos (Grecco et al. 2009), ovinos (Santurio et al. 2008), caninos (Pereira et al. 2013) e raramente em humanos (Marques et al. 2006). Na região Sul do Rio Grande do Sul (RS), Marcolongo-Pereira et al. (2012), demonstraram que a pitiose equina é endêmica atingindo prevalências de 14,5% e correlacionaram a ocorrência da enfermidade com campos planos e sujeitos a alagamentos, propícios ao desenvolvimento do agente.

Dependendo da espécie de hospedeiro infectado, a enfermidade pode manifestar-se na forma cutânea/subcutânea, gastrointestinal, oftálmica ou sistêmica o que acarreta a prescrição de diferentes protocolos terapêuticos no tratamento da pitiose em animais e no homem. No entanto, os resultados variam consideravelmente (GAASTRA et al. 2010).

Considerando-se as dificuldades de opções terapêuticas eficazes para a pitiose, muitas pesquisas têm buscado alternativas terapêuticas com diferentes classes de compostos antimicrobianos, incluindo agentes antifúngicos e não antifúngicos (PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2012; ZANETTE et al., 2015; JESUS et al., 2014, LORETO et al., 2018) Dentre estas investigações ressalta-se a atividade antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae e *Melaleuca alternifolia* (FONSECA et al., 2015; VALENTE et

al., 2016), bem como de compostos extraídos de plantas, incluindo raízes e frutos (SRIPHANA et al. 2013; SUTHIWONG et al. 2014).

O potencial antimicrobiano de *Melaleuca alternifolia* é atribuído aos seus componentes majoritários terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α-terpineol, terpinoleno e α- e Y-terpineno que perfazem aproximadamente 90% da composição do óleo essencial (BROPHY et al., 1989). Suas propriedades antimicrobianas são bem evidenciadas sobre diferentes micro-organismos, incluindo bactérias, vírus, fungos e oomicetos (*P. insidiosum*) (BAKKALI et al., 2008, FONSECA et al., 2015, VALENTE et al., 2016). No entanto, de acordo com Raut e Karuppayil (2014), em alguns casos tem-se observado que os constituintes majoritários dos óleos essenciais, quando avaliados isoladamente, podem apresentar melhor atividade sobre determinados micro-organismos. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar e comparar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e seu composto majoritário α-terpineol sobre isolados de *P. insidiosum*.

2. METODOLOGIA

O teste de suscetibilidade *in vitro* empregando o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* e α-terpineol foi realizado frente a 10 isolados de *P. insidiosum* pertencentes ao Laboratório de Micologia (LABMICO) (Instituto de Biologia – Universidade Federal de Pelotas). O óleo essencial utilizado neste estudo foi obtido comercialmente da empresa Ferquima Inc. e Com. Ltda e o composto majoritário foi adquirido da empresa Sigma (Aldrich Ltda).

Os testes *in vitro* foram realizados utilizando como inóculo hifas de *P. insidiosum*, seguindo a metodologia descrita por Fonseca et al.(2014). O inóculo foi preparado a partir do cultivo de duas placas de Petri contendo agar levedura, incubadas durante quatro dias em estufa a 37°C. Sobre estas culturas foi dispensado um volume de 10mL de água destilada estéril e o micélio foi raspado com auxílio de lâmina de bisturi esterilizada. Essa solução foi transferida para um tubo de ensaio e o inóculo obtido foi então ajustado em espectrofotômetro a uma transmitância de 80 a 85%. Logo após foi diluído em meio RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS na concentração 1:9.

O teste utilizado baseou-se no método de microdiluição em caldo, seguindo as normas descritas no documento M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute)(2008) adaptado para testes com fitofármacos. A partir da solução-estoque de 56000µg/mL do compostos avaliados, foram preparadas dez diluições sucessivas que variaram de 1000,96 a 1,95µg/mL em meio RPMI.

Alíquotas de 100µL dessas concentrações foram dispensadas sequencialmente nas microplacas, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. A estas colunas foi distribuído um volume de 100µL do inoculo. Para cada teste foram utilizadas colunas controle positivo (inoculo+meio de cultura) e negativo (diluição do óleo+meio). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40rpm, durante 48 horas. Todos os testes foram realizados em quadruplicata.

A leitura considerou o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração em que não houve o crescimento de hifas. As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Para isto, 100 µL da diluição foram transferidos para tubos contendo 900µL

de caldo Sabouraud, ficando incubados a 37C por 24 horas. A menor concentração dos compostos avaliados que não evidenciaram crescimento foi considerada a CFM. Adicionalmente, foram calculadas a CIM₅₀ (menor concentração capaz de inibir 50% dos isolados) e CIM₉₀ (menor concentração capaz de inibir 90% dos isolados).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

M. alternifolia (“tea tree” ou árvore do chá) é uma planta da família Myrtaceae, ordem Mytales (RUSSEL; SOUTHWELL, 2002) e tem sido utilizada na terapêutica por possuir propriedades antimicrobianas conhecidas há muitos anos (CARSON; RILEY, 1998; HALCON; MILKUS, 2004). Esta atividade antimicrobiana é atribuída aos componentes majoritários terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α terpineol, terpinoleno e α- e Y-terpineno, os quais compreendem 90% da composição química desse óleo (BROPHY et al., 1989).

Neste estudo, o óleo de *M. alternifolia*, apresentou CIM que variou de 531,5 a 2125 μ g/mL, sendo a CIM₅₀ 1062,5 μ g/mL e a CIM₉₀ 2125 μ g/mL. Observou-se que a CFM foi igual à CIM. Esses resultados foram similares aos relatos de Valente et al. (2016) ao testarem a suscetibilidade *in vitro* de 26 isolados clínicos de *P. insidiosum* frente ao óleo essencial de *M. alternifolia*. Na literatura estudos avaliando a ação anti-*P. insidiosum* de compostos majoritários de óleos essenciais de plantas são escassos. Apenas Jesus et al (2014) avaliaram a atividade de carvacrol e timol frente a 23 isolados de *P. insidiosum*. Ao avaliar-se o composto majoritário terpineol, verificou-se que a CIM variou de 7,82 a 670,71 μ g/mL, sendo a CIM₅₀ 62,56 μ g/mL e a CIM₉₀ 250,24 μ g/mL. Comparando-se os valores de CIM do terpineol aos resultados da CIM do óleo essencial de *M. alternifolia*, evidenciou-se que a CIM do composto majoritário foi menor, demonstrando que, *in vitro*, a atividade antimicrobiana do componente majoritário foi superior ao óleo essencial. Estes resultados estão de acordo com Raut e Karuppayil (2014) que afirmaram que em alguns casos tem-se observado que os constituintes majoritários apresentaram melhor atividade sobre determinados micro-organismos do que o óleo essencial. Por outro lado, Bakkali et al. (2008) relataram que é possível que a atividade dos componentes majoritários seja modulada por outras moléculas menores, o que pode influenciar a distribuição celular do óleo. Esta última característica é importante, uma vez que estabelece diferentes tipos de reações celulares. Nesse sentido, para fins biológicos, seria mais informativo estudar um óleo inteiro do que alguns de seus componentes, parecendo o conceito de sinergismo ser mais significativo.

Segundo RAO et al. (2010), a atividade antimicrobiana dos componentes majoritários dos óleos essenciais podem afetar a homeostase dos íons de Ca²⁺ e H⁺ por interferência na permeabilidade dos canais iônicos. Além disso, esses autores relatam que esses constituintes podem interferir na via de sinalização TOR, resultando na perda da viabilidade da célula.

4. CONCLUSÕES

Os resultados preliminares obtidos no presente estudo sugerem que tanto o óleo essencial de *M. alternifolia* quanto seu constituinte terpineol possuem propriedades anti-*P. insidiosum*. Embora o composto majoritário terpineol tenha evidenciado atividade antimicrobiana superior ao óleo, outros ensaios utilizando

um maior número de isolados são necessários para melhor avaliar a suscetibilidade de *P. insidiosum* a estes compostos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BAKKALI F. et al. Biological effects of essential oils a review. *Food and Chemical Toxicology*. v.46, n.2, p.446-475, dec. 2008.
- BROPHY, J.J. et al. Gaschromatographic quality control for oil of *Melaleuca* terpinen-4-ol type (Australian tea tree). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 37, n.5, p. 1330-1335, sept. 1989.
- GAULIN E, Bottin A, Dumas B. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. *Plant Signaling & Behavior* 2010: 258-60.
- JESUS F.P. et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. v.60, n.1, p.87-91, oct. 2015a.
- MENDOZA L, Vilela R. The mamalian pathogenic oomycetes. *Current Fungal Infection Reports*. 2013;7:198-208.
- MILLER, R. I. Investigations into the biology os three „phycomycotic“ agents pathogenic for horses in Australia. *Mycopatologia*. v.81, p. 23-28, 1983.
- PEREIRA DIB, Botton SA, Azevedo MI, Motta MA, Lobo RR, Soares MP, Fonseca AOS, Jesus FPK, Alves SH, Santurio JM. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. *Mycopathologia* 2013;176:309–15.
- RAO A, Zang V, Muend S, Rao R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2010;54:5062-69.
- RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I. Monoterpenoid accumulation in *Melaleuca alternifolia* seedlings. *Phytochemistry*, v. 59, n. 7, p. 709-716, 2002.