

ATIVIDADE ANTI-PYTHIUM INSIDIOSUM DO ÓLEO DE GIRASSOL PURO E OZONIZADO

CAROLINE QUINTANA BRAGA¹; CRISTINA GOMES ZAMBRANO²; CAROLINA DOS SANTOS BERMANN³; WALDENIS DA TRINDADE JUNIOR⁴, ANGELITA MILECH⁵, DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA⁶

¹UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – carolineqbraga@hotmail.com

²MÉDICA VETERINÁRIA E ESPECIALISTA EM OZONIOTERAPIA – cris-zambrano@hotmail.com

³UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – carolbermann@hotmail.com

⁴UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – waldenis.junior@gmail.com

⁵UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – angelitamilech@gmail.com

⁶UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Os oomicetos são eucariotos Stramenopiles que habitam ecossistemas de água doce e ambientes terrestres. Embora compartilhem muitas características com os fungos verdadeiros são considerados *fungal-like* (GAULIN et al., 2010). Neste grupo, está classificado um oomiceto zoopatógeno, *Pythium insidiosum* que é o agente etiológico da pitiose em mamíferos (GAASTRA et al., 2010). Trata-se de uma doença de caráter invasivo e rápida progressão, que apesar dos avanços e das diversas terapias disponíveis, muitos casos apresentam insucessos e os resultados variam, apresentando altas taxas de mortalidade (HILTON et al., 2016).

O tratamento eficaz para a pitiose não está completamente estabelecido, contudo, pesquisadores vêm estudando o efeito de óleos essenciais e compostos naturais sobre *P. insidiosum* com resultados promissores (FONSECA et al. 2015a; VALENTE et al., 2016a,b; TROLEZI; AZANHA, 2017). Estes compostos apresentam como vantagens a baixa toxicidade às células dos mamíferos e o menor impacto ambiental (FONSECA et al. 2015b).

O óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) por sua vez, tem aplicações em diversas finalidades como na indústria cosmética, farmacêutica e alimentícia, sendo também muito utilizado como agente cicatrizante com atividade antimicrobiana. Este óleo tem como principais componentes majoritários os ácidos linoleicos e oleicos. A aceleração do processo inflamatório gerado pelo uso do óleo de semente de girassol propicia uma rápida formação do tecido de granulação e epitelização no tratamento de feridas (MARQUES et al. 2004).

A ozonioterapia é uma técnica da medicina integrativa que quando utilizada nos óleos potencializa seus efeitos. A ozonioterapia tem sido empregada na medicina veterinária para o tratamento de diversas enfermidades incluindo infecções bacterianas, fúngicas, virais, parasitárias, entre outras. A literatura relata os diversos benefícios do ozônio, uma vez que ativa o sistema antioxidante do organismo, aumenta a imunidade e melhora a perfusão sanguínea, o que explica sua ação antimicrobiana, antineoplásica, anti-inflamatória e analgésica (RODRÍGUEZ et al. 2018).

Na medicina veterinária o óleo de girassol ozonizado tem sido utilizado como antisséptico e estimulante da cicatrização (SANCHEZ ,2008), no tratamento de mastite subclínica em bovinos (QUINTANA et. al., 2019) e de infecções fúngicas (RODRÍGUEZ et al. 2018).

O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade anti-*P. insidiosum* do óleo de girassol puro (OG) e na forma ozonizada (OGO).

2. METODOLOGIA

Foram utilizados dez isolados de *P. insidiosum*, sendo oito isolados oriundos de equinos naturalmente infectados, provenientes do Estado do Rio Grande do Sul, uma cepa padrão de origem equina (CBS 101555) e uma cepa de origem humana (CBS 119453). Todos os isolados avaliados foram identificados molecularmente e pertencem a micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas/ Instituto de Biologia. Os testes de microdiluição em caldo seguiram o protocolo M38-A2 do CLSI (2008) (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) com adaptações. O inóculo foi preparado a partir de cultura micelial de *P. insidiosum*, conforme descrito por Fonseca et al. (2014). O óleo de girassol (OG) (*Helianthus annus*) foi obtido da empresa Ferquima e o óleo de girassol ozonizado (OGO) foi obtido comercialmente pelo fabricante Ozone & Life. A composição do óleo foi fornecida pelos fabricantes, sendo seus componentes majoritários: ácido linoleico (65%), ácido oleico (20%), ácido palmítico (5%) e ácido esteárico (5%). A solução-estoque do óleo foi preparada adicionando-se 450.000µg do óleo em 8.000µL de RPMI e 50µL de Tween 80 obtendo a concentração de 56.000µg/mL. A partir das soluções-estoque, foram preparadas dez diluições sucessivas em meio RPMI 1640, as quais variaram de 56.000 a 0,05µg/mL. Alíquotas de 100µL de cada diluição foram dispensadas a cada poço das microplacas e adicionado igual volume do inóculo. Para cada teste foi utilizado um controle positivo (inóculo + RPMI) e negativo (óleo + RPMI). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação/40rpm/48horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A leitura foi visual e levou em consideração o crescimento ou não de hifas. A menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* foi identificada como a concentração inibitória mínima (CIM). As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da concentração oomicida mínima (COM). Para isto, 100 µL da diluição foram transferidos para tubos contendo 900 µL de caldo Sabouraud, ficando incubados a 37°C/48 horas. A menor concentração do óleo que não evidenciou crescimento foi considerada a COM.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dos ensaios *in vitro* evidenciaram que o OG e OGO apresentaram atividade antimicrobiana frente a *P. insidiosum*, com concentrações inibitórias mínimas de 28.000µg/mL e 1.750-3.500µg/mL, respectivamente. Observou-se que a concentração inibitória capaz de inibir 50% dos isolados (CIM₅₀) e a CIM₉₀ (inibição de 90% dos isolados) foi de 28.000µg/mL para o OG. Já a CIM₅₀ foi de 1.750 µg/mL e a CIM₉₀ foi 3.500 µg/mL para o OGO. Esses resultados foram similares aos descritos por Zambrano et al. (2019) ao avaliarem a atividade antimicrobiana do OGO frente a *P. insidiosum*.

As concentrações oomicidas mínimas foram iguais às CIM para todos os isolados do oomiceto. Estes resultados são similares aos estudos prévios de Fonseca et al. (2015a) e Valente et al. (2016^{a, b}) ao avaliarem a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* a óleos essenciais de plantas, incluindo *Origanum vulgare*, *Origanum marjorana*, *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita* e *Melaleuca alternifolia* e óleo de girassol ozonizado (Zambrano et al., 2019).

Observou-se que o OGO apresentou 3 vezes melhor atividade antimicrobiana ao OG, o que pode ser explicado pelo fato que as propriedades

antimicrobianas do óleo de girassol são potencializadas quando o óleo é ozonizado. Assim, o ozônio reage com os triglicerídeos insaturados presentes no óleo dando origem a uma série de espécies de peróxidos, os quais são responsáveis pela ampla atividade biológica do óleo (RODRÍGUEZ et al., 2018). Segundo Weiller (2013) o óleo de girassol na sua forma ozonizada é capaz de reduzir feridas e também atua na redução do processo inflamatório.

Pesquisas demonstram a ação antifúngica de óleo de girassol ozonizado sobre dermatófitos e espécies de *Candida* (RODRÍGUEZ et al. 2018). Também é relatada a ação antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* isolado de mastite subclínica sendo considerada uma alternativa de tratamento, devido à facilidade de tratamento, baixa dosagem e poucas aplicações, além de não deixar resíduos no leite (QUINTANA et al., 2019). Portanto, a ozonioterapia constitui-se num tratamento adicional e benéfico que vem se somar como uma terapia na medicina veterinária (PENIDO et al., 2010).

Estudos demonstram a atividade de vários óleos essenciais sobre isolados de *P. insidiosum*, (FONSECA et al., 2015a; VALENTE et al., 2016a,b,). Assim, nosso estudo soma a estes estudos na terapêutica da pitiose experimental.

4. CONCLUSÕES

Os resultados observados permitem inferir que o óleo de girassol ozonizado possui atividade anti-*Pythium insidiosum*, podendo ser uma alternativa no tratamento da pitiose. No entanto, outras pesquisas são imprescindíveis para comprovar sua atividade em animais enfermos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

FONSECA, A.O.S.; PEREIRA, D.I.B.; MAIA FILHO, F.S. 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, 2014.

FONSECA, A.O.S.; PEREIRA, D.I.B.; JACOB, R.G. et al. *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, 2015a.

FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; BOTTON, S.A. 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, agosto, p.265-269, 2015b.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L.J.A.; COCK, A.W.A.M. et al. *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, p. 258-260, 2010.

HILTON RE et al. Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. **British Journal of Dermatology.**; v.175, p. 394-397, 2016.

MARQUES, S.R.; PEIXOTO, C.A.; MESSIAS, J.B. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta. Cir. Bras.** 19(3): 196-209, 2004.

PENIDO, B.R.; LIMA, C.A.; FERREIRA, L.F.L. Aplicações da ozonioterapia na clínica veterinária. **PUBVET**, Londrina, v. 4, n. 40, Ed. 145, Art. 978, 2010.

QUINTANA, M. C. F.; DOMINGUES, I. M.; RIBEIRO, A. R. Uso de óleo ozonizado no tratamento de mastite subclínica em vaca Jersey: Relato de caso. **PUBVET**, v.13, n.5, p.1-4, 2019.

RODRÍGUEZ, Z.B.Z.; GONZALEZ, E.F.; LOZANO, O.L.; URRUCHI, W.I. **Ozonioterapia em Medicina Veterinária**. São Paulo: Multimidia Editora, 1 ed, 282 p., 2017.

SANCHEZ, C. M. S; **A utilização do óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinhos da índia (*Cavia porcellus*) – relato de caso.** 38f. Trabalho monográfico de conclusão do curso, Universidade Castelo Branco, Brasil, 2008.

TROLEZI R et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobial** v.1, p.:1-7., 2017.

VALENTE, J.S.S.; FONSECA, A.O.S.; BRASIL, C.L. et al. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in its free oil and nanoemulsion formulations against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**. v.181, n.11-12, p. 865-869, 2016.

VALENTE J.S.S., FONSECA A.O.S., DENARDI L.B., et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. **Mycopathologia**.v.181, n.5-6, 2016b.

WEILLER, C.M.B. **Tratamento de feridas diabéticas em membros inferiores com óleo de girassol.** 2013. 72f. Dissertação (Mestrado) – Bioengenharia. Universidade Camilo Castelo Branco, 2013.

ZAMBRANO, C.G; BRAGA, C.Q.; VALENTE J.S.S., et al. ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO: ATIVIDADE ANTI-PYTHIUM INSIDIOSUM. **Anais do I Encontro Científico Internacional de Ozonioterapia.** v1. p.188-119, 2019.