

NANO-PARTÍCULAS BIOGÊNICAS DE PRATA: ATIVIDADE ANTI-*PYTHIUM INSIDIOSUM*

JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE¹; CAROLINA LITCHINA
BRASIL¹; WALDENIS TRINDADE JÚNIOR¹; MAURO PEREIRA SOARES¹;
SIMONE SILVEIRA DA SILVA¹; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA²

¹Laboratório de Micologia-Universidade Federal de Pelotas – juliassilveira@gmail.com

² Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

A pitiose é uma doença grave registrada no Rio Grande do Sul a qual é ocasionada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum*. Esta enfermidade acomete mamíferos causando lesões graves e de rápida evolução que podem levar os indivíduos acometidos à morte quando não tratada (GAASTRA et al., 2010).

Os oomicetos caracterizam-se metabolicamente pela necessidade de incorporar esteróis exógenos à sua estrutura para desempenhar funções fisiológicas. Com isso, estes micro-organismos apresentam resistência aos tratamentos antifúngicos que agem sobre os esteróis de membrana (LERKSUTHIRATET al., 2017).

A gravidade da doença e as dificuldades encontradas no tratamento da pitiose impulsionam a realização de estudos com compostos naturais e antimicrobianos que visam ampliar o arsenal de compostos com atividade anti-*Pythium* (VALENTE, 2016; PERMPALUNG et al., 2019).

As nanopartículas de prata são conhecidas por apresentarem atividade antimicrobiana, sendo utilizadas para diversas finalidades, incluindo a formulação de cremes para tratamento de dermatites atópicas (RUGIDO-SANTOS, et al., 2019), formulação de antimicrobianos com atividade antifúngica (RADHAKRISHNAN et al., 2018), antibacteriana (GOYAL et al., 2018), antiviral (SZYMAŃSKA et al., 2018).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi verificar a atividade *in vitro* anti-*P. insidiosum* de uma formulação de nanopartículas de prata biogênicas (bio-AgNP).

2. METODOLOGIA

As bio-AgNP foram formuladas pelo método previamente descrito e patenteado por DURÁN et al. (2005), com modificações.

Para os testes de suscetibilidade *in vitro* utilizou-se dez isolados de *P. insidiosum*, caracterizados molecularmente conforme AZEVEDO et al. (2012) e a técnica seguiu o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008). Como inóculo empregou-se uma suspensão de hifas preparada conforme descrita por FONSECA et al. (2014). A bio-AgNP foi diluída em meio RPMI e as concentrações testadas variaram de 0,0075 a 3,76 mg/mL. Foram feitos controles positivos do crescimento de *P. insidiosum*, nos quais foi adicionado somente RPMI e o inóculo, e controles negativos, nos quais adicionou-se RPMI e bio-AgNP. As placas foram incubadas a 37°C sob agitação constante (XX RPM) em estufa orbital durante 48 horas. A leitura foi visual e levou em consideração o crescimento ou não de hifas. A menor concentração da bio-AgNP 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 por 48 horas. A menor concentração da bio-AgNP que não evidenciou crescimento foi considerada a COM. Os testes foram realizados em quadruplicata.

Para a análise de microscopia eletrônica, utilizou-se a cepa padrão CBS 101555 seguindo o protocolo de preparação descrito por Bona et al. (2016) com modificações. A partir do teste de suscetibilidade *in vitro* selecionaram-se as hifas da concentração de bio-AgNP onde houve o crescimento hifal imediatamente após a COM (0,12mg/L) a qual foi considerada a concentração subletal. Como controle empregou-se hifas de *P. insidiosum* sem tratamento.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de inibição da bio-AgNP sobre os dez isolados de *P. insidiosum* variaram de 0,06 a 0,47mg/L. Verificou-se que a CIM₅₀ (concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados) foi de 0,24mg/L e a CIM₉₀ (concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados) foi de 0,47mg/L. As COMs foram iguais às CIMs para todos os isolados.

Estudos demonstram o potencial antimicrobiano de AgNP, sendo aplicadas em diversas áreas incluindo hospitalar, formulação de cremes ou soluções para tratamento de feridas, queimaduras ou úlceras cutâneas (LOHANI et al., 2014; WU et al., 2014). Os valores de CIM observados no presente estudo foram similares as observações de XU et al. (2013) que ao testar AgNP contra fungos resistentes causadores de ceratites oculares, encontraram CIM muito semelhantes variando de 0,0625-1,0 mg/L para diversas espécies de *Aspergillus* e de 0,25-1mg/L para *Alternaria alternata*.

Na MET pode-se observar a ultraestrutura de *Pythium insidiosum* (CBS 101555) (Figura A). Na amostra controle (não tratada) evidenciou-se a presença de parede celular espessa e com aspecto homogêneo e foi possível visualizar as organelas intracitoplasmáticas (Figura A-1 e A-2). Quando as hifas de *P. insidiosum* foram tratadas com bio-AgNP observou-se que a parede celular apresentava-se fracamente impregnada pelo ósmio e com múltiplas zonas eletrodensas. Adicionalmente, os elementos intracitoplasmáticos apresentavam-se homogêneos não sendo possível diferenciar as estruturas das organelas. Observou-se também que a parede celular apresentava-se rarefeita, com as bordas enrugadas e parcialmente rompida (Figura A-3 e A-4). RADHAKRISHNAN et al. (2018) ao avaliar por MET as lesões de AgNP sobre *Candida albicans* relataram comprometimento da integridade de parede e membrana celular, sugerindo que estas alterações podem ser devido ao dano celular nestas estruturas. No presente estudo, efeitos similares foram observados na ultraestrutura de *P. insidiosum*. RADHAKRISHNAN et al. (2018) sugerem que a atividade antifúngica das AgNP está relacionada à indução da apoptose, por disfunção mitocondrial associada com o aumento do estresse oxidativo através da geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), destacando-se, especialmente, os radicais hidroxila.

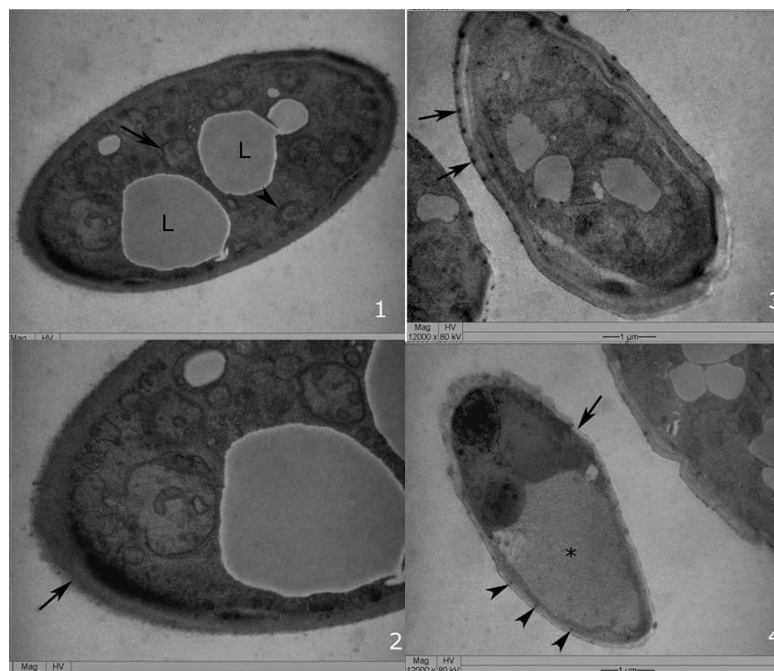


Figura A. Ultraestrutura de *Pythium insidiosum* (CBS 101555) visualizadas em MET. 1. Amostra controle (não tratada). Citoplasma exibindo mitocôndria (seta), lipídeo (L) e complexo de golgi(cabeça de seta). 2. Amostra controle (não tratada). Parede celular espessa e com aspecto homogêneo (seta). 3. Amostra tratada com 0,12µg/mL de nanopartículas de prata (bio-AgNP). A parede celular apresenta-se fracamente impregnada pelo ósmio e com múltiplas zonas eletrodensas ao longo da parede celular (seta). Os elementos intracitoplasmáticos apresentam-se homogêneos e não se diferencia a estrutura das organelas. 4. Amostra tratada com nanopartículas 0,12µg/mL de prata (bio-AgNP). Parede rarefeita, com as bordas enrugadas (seta) podendo ainda ser encontradas zonas eletrodensas (cabeça de seta). Na região superior a parede celular encontra-se rugosa e parcialmente rompida. Ocorre o desaparecimento das organelas intracitoplasmáticas restando apenas um material de aspecto homogêneo (*).

4. CONCLUSÕES

O composto contendo bio-AgNP avaliado apresenta excelente atividade *in vitro* anti-*P.insidiosum*. No entanto, futuros estudos sobre sua ação *in vivo* são imprescindíveis para determinar sua possibilidade de uso no tratamento da enfermidade nos hospedeiros acometidos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo MI, Pereira DIB, Botton AS, Costa MM, Mahl CD, Alves SH, Santurio JM. *Pythium insidiosum*: morphological and molecular identification of Brazilian isolates. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.32, p.619-22, 2012.

Durán, N., Marcato, P.D., Alves, O.L., Souza, G.I., Esposito, E. 2005. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**. V.3, p:1-7, 2005.

Bona E, Cantamessa S, Pavan M *et al*. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? **Journal of Applied Microbiology** 12:1530-45, 2016.

Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi_Second Edition: Approved Standard M38-A2 CLSI Wayne, PA, USA 2008.

Fonseca AOS, Pereira DIB, Maia Filho FS *et al.* *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.69, p.1564-67, 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.

LERKSUTHIRAT T, et al. Evolution of the Sterol Biosynthetic Pathway of the Sterol Biosynthetic Pathway of *Pythium insidiosum* and Related Oomycetes Contributes to Antifungal Drug Resistance. **Antimicrobial of Agents Chemotherapy**. n. 4, p 1-37, 2017.

VALENTE J.S.S., 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.

PERMALUNG N. et al. Clinical outcomes in ocular pythiosis patients treated with a combination therapy protocol in Thailand: A prospective study. **Medical Mycolgy**. n.1, p1-6, 2019.

RADHAKRISHNAN VS, REDDY MUDIAM MK, KUMAR M. Silver nanoparticles induced alterations cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). **International Journal of Nanomedicine**. n.13, p. 2647-63, 2018.

SZYMAŃSKA, E., ORŁOWSKI, P., WINNICKA, K., TOMASZEWSKA, E., BAŚKA, P., CELICHOWSKI, G., GROBELNY, J., BASA, A., KRZYŻOWSKA, M. Multifunctional Tannic Acid/Silver Nanoparticle-Based Mucoadhesive Hydrogel for Improved Local Treatment of HSV Infection: *in vitro* and *in vivo* studies. **International Journal of Molecular Science**, v. 19, p. 1-21, 2018.

LOHANI A., et al. Nanotechnology-based cosmeceuticals. **ISRN Dermatology**; n.22, p.1-14, 2014.

WU, J., ZHENG, Y., SONG, W., LUAN, J., WEN, X., WU, Z., CHEN, X., WANG, Q., GUO, S. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. **Carbohydrate Polymers**. v. 15, p. 762-771, 2014.

XU Y et al. He *In vitro* antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**; n.29, p.:270-74.

RADHAKRISHNAN VS, REDDY MUDIAM MK, KUMAR M. Silver nanoparticles induced alterations cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). **International Journal of Nanomedicine**.v. 13, p. 2647-63, 2018.