

## ATIVIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO DE GIRASSOL E OLIVA PURO E OZONIZADO SOBRE O OOMICETO PATÓGENO *Pythium insidiosum*

**ISABELLA RODRIGUES DE ANDRADE<sup>1</sup>; CAROLINE QUINTANA BRAGA<sup>2</sup>;**  
**CRISTINA GOMES ZAMBRANO<sup>3</sup>; AUGUSTO DUARTE BROD.<sup>4</sup>; CASSIANE**  
**BORGES DE SOUZA<sup>5</sup>; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA<sup>6</sup>**

<sup>1</sup>Universidade Federal de Pelotas – [andradeisabella52@gmail.com](mailto:andradeisabella52@gmail.com)

<sup>2</sup>Universidade Federal de Pelotas – [carolineqbraga@hotmail.com](mailto:carolineqbraga@hotmail.com)

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas – [cris-zambrano@hotmail.com](mailto:cris-zambrano@hotmail.com)

<sup>4</sup>Universidade Federal de Pelotas- [adbrosd@gmail.com](mailto:adbrosd@gmail.com)

<sup>5</sup>Universidade Federal de Pelotas- [casborges96@gmail.com](mailto:casborges96@gmail.com)

<sup>6</sup>Universidade Federal de Pelotas- [danielabrayer@gmail.com](mailto:danielabrayer@gmail.com)

### 1. INTRODUÇÃO

O oomiceto *Pythium insidiosum* é o principal causador da pitiose, uma doença grave e de rápida evolução que afeta as mais variadas espécies de mamíferos desde equinos, caninos, bovinos, felinos, humanos e algumas espécies silvestres (GAASTRA et al., 2010). No Brasil dentre as espécies mais afetadas estão os equinos com casos descritos em regiões alagadiças e pantanosas de clima tropical, subtropical e temperado principalmente na região Sul, no Pantanal matogrossense e nordeste (PEREIRA; MEIRELES, 2023). *P. insidiosum* por ser um oomiceto realiza seu ciclo biológico em ambientes aquáticos, onde formam seus zoósporos infectantes que ao serem liberados nas águas são atraídos para os pelos dos animais e penetram na pele através de lesões preexistentes, produzindo assim a enfermidade (MENDOZA et al., 1996).

Em equinos a pitiose caracteriza-se pelo desenvolvimento de grandes lesões granulomatosas, ulcerativas no tecido cutâneo e subcutâneo de aspecto tumoral (PEREIRA; MEIRELES, 2023). No interior dessas lesões há o desenvolvimento de massas necróticas, com aspecto de corais, formadas por hifas recobertas por células inflamatórias mortas, denominadas *kunkers* (GAASTRA et al., 2010; CHAFFIN et al., 1995). A presença de *kunkers* tem um papel no ciclo biológico de *P. insidiosum*, pois essas se desprendem facilmente das lesões e contaminam as águas, refazendo assim o ciclo desse oomiceto e mantendo a re-contaminação dos ambientes aquáticos (FONSECA et al., 2014; PEREIRA; MEIRELES, 2023).

Por ser um oomiceto, *P. insidiosum* não possui ergosterol em sua membrana e apresenta uma via incompleta de biossíntese de esteróis. Sendo assim, as terapias convencionais com antifúngicos que atuam inibindo a síntese de ergosterol se mostram ineficientes para o tratamento dessa enfermidade (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Embora a cirurgia e a imunoterapia sejam os protocolos comumente utilizados no tratamento da doença (GAASTRA et al., 2010), outras terapias integrativas devem ser pesquisadas para melhorar o prognóstico e a cura da doença.

A ozonioterapia é uma técnica da medicina integrativa que utiliza 95% de O<sub>2</sub> e 5% de O<sub>3</sub>, sendo empregada na forma sistêmica, local e tópica. Esta última aplicação inclui o uso de óleos ozonizados. A ozonioterapia promove uma série de efeitos benéficos incluindo efeitos analgésicos, cicatrizante, imunomodulação, e ação bactericida, fungicida, , virucida e antiparasitária (RODRÍGUEZ et al., 2018).

O objetivo deste estudo foi verificar a inibição *in vitro* do crescimento micelial de *P. insidiosum* exposto aos óleos de girassol e de oliva puro e ozonizado.

## 2. METODOLOGIA

Para a realização do teste foram avaliados nove isolados de *P. insidiosum*, oriundos de equinos (n=7) naturalmente infectados e uma cepa padrão equina CBS 101555. Todos os isolados pertencem à pitioteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas. Os isolados clínicos foram identificados por suas características macro e micromorfológicas e confirmados molecularmente conforme descrito por Azevedo et al. (2012).

O óleo de oliva ozonizado® (OLO) e o óleo de girassol ozonizado® (OGO) utilizado no presente estudo foram gentilmente cedidos pela empresa Philozon. As especificações sensoriais e físico-químicas do óleo foram fornecidas pela empresa fabricante (Philozon). O óleo de girassol (OG) (Ferquima) e o óleo de oliva (OL) (Verde Louro) foram adquiridos comercialmente.

Para cada isolado de *P. insidiosum* avaliado, duplicatas de placas de Petri contendo agar levedura 0,1% foram utilizadas para os ensaios. Cada placa foi dividida em três partes iguais (Parte A, Parte B e Parte C), sendo que uma parte foi utilizada para o controle (Parte A- sem tratamento) a segunda parte para o tratamento com o óleo não ozonizado (Parte B) e a terceira parte para o tratamento com o óleo ozonizado (Parte C). Um bloco medindo 1cmx1cm de diâmetro foi obtido a partir das culturas miceliais de *P. insidiosum* e imediatamente depositados no centro da parte A da placa (controle). Na parte B (tratamento com OL), primeiramente foi adicionado ao centro da placa 25µL de OL e sobre o óleo foi colocado o bloco de cultura de *P. insidiosum*, o qual foi recoberto com 25µL de OL. Na parte C (tratamento com OLO), primeiramente foi adicionado ao centro da placa 25µL de OLO e sobre o óleo foi colocado o bloco de cultura de *P. insidiosum*, o qual foi recoberto com 25µL do OLO. O mesmo processo foi realizado para o OG e OGO. Os ensaios foram realizados em duplicata e todas as placas foram incubadas a 37° C/72 horas.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos ensaios *in vitro* observou-se que houve abundante crescimento micelial de *P. insidiosum* no lado controle das placas (parte A) de ambos os testes. No tratamento com OG evidenciou-se crescimento do oomiceto, porém reduzido, se comparado ao controle. Já no tratamento com OGO (parte C) evidenciou-se ausência total de crescimento micelial de *P. insidiosum*. Nas placas tratadas com o óleo de oliva (OL) e oliva ozonizado (OLO) observou-se inibição do crescimento micelial do microrganismo tanto no tratamento com o OL como com OLO, com exceção de dois isolados que apresentaram crescimento reduzido no tratamento com OL.

Os resultados obtidos neste estudo evidenciam a potente ação anti- *P. insidiosum* dos óleos de girassol e oliva ozonizados. Destaca-se também a ação inibitória do óleo de oliva sobre o oomiceto. Previamente, Zambrano et al. (2019) evidenciaram a capacidade do OGO e do OLO em inibir o crescimento micelial de *P. insidiosum* em ensaios *in vitro*. Similarmente, Ferreira et al. (2021) descreveram a atividade antimicrobiana de diversas preparações do ozônio sobre *P. insidiosum*, incluindo o OGO. Adicionalmente, estudos de campo têm mostrado que a integração da ozonioterapia aos protocolos terapêuticos da pitiose tem trazido bons resultados (dados não publicados).

O óleo de oliva e de girassol são os óleos vegetais mais frequentemente submetidos à ozonização. Os produtos de oxidação lipídica gerados após a reação do ozônio com os ácidos graxos presentes nesses óleos originam compostos com atividade antimicrobiana, imunomoduladora e com propriedade de reparação tecidual. Além disso, a estabilidade das preparações ozonizadas permite o desenvolvimento de formulações para uso clínico (MARTÍNEZ-SANCHEZ et al., 2012). Desta forma, o emprego de óleos ozonizados em doenças infecciosas pode apresentar numerosas vantagens incluindo terapias de baixo custo, amplo espectro, efeitos similares ou superiores aos antimicrobianos tradicionais e absolutamente atóxica, quando empregada em dosagens que induzem apenas o estresse oxidativo (MARTÍNEZ-SANCHEZ et al., 2012; RODRÍGUEZ et al., 2018).

#### 4. CONCLUSÕES

A relevante atividade anti-*P.insidiosum* dos óleos ozonizados avaliados neste estudo, permite inferir que tanto o OLO quanto o OGO tem potencial terapêutico integrativo na pitiose. Embora dados mostrem que o OGO tem efeitos benéficos como terapia integrativa em lesões cutâneas de pitiose em equinos, mais estudos são requeridos para comprovar a ação desses óleos ozonizados, incluindo o OLO, em lesões clínicas de pitiose.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AZEVEDO, M. I., PEREIRA, D.I.B., BOTTON, S.A. et al. *Pythium insidiosum*: morphological and molecular identification of Brazilian isolates. *Pesq Vet Bras* 32: 619–622, 2012.
- CHAFFIN M.K. et al. Cutaneous pythiosis in the horse. *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, v.11, n.1, p. 91-103, 1995.
- FERREIRA, J. C. et al. The *in vitro* effect of ozone therapy against equine *Pythium insidiosum*. *J. Equine Vet. Sci.*, v.98, p. 103305, 2021.
- FOIL, C.S.O. Update on Pythiosis (Oomycosis). *The North American Veterinary Conference*. p. 57-63, 1996.
- FONSECA, A.O. 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.
- GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: An overview. *Veterinary Microbiology*, v.146, n. 1, p. 1–16, 2010.
- GROOTERS, A. M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. *The Veterinary Clinics Small Animal Practice*, v.33, p. 695-720, 2003.
- MARTÍNEZ-SÁNCHEZ, G. et al. Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. **Revista Española de Ozonoterapia**, Madrid, v.2, p.121-139, 2012.

MENDOZA, L. et al. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. *Journal de Mycologie Médical*, v.6, n.4, p. 151-164, 1996.

PEREIRA, D.I.B. et al. (Org). *Doenças de Ruminantes e Equídeos*. São Paulo: MedVet, v.1, p. 480- 489, 2023.

RODRÍGUEZ, Z.B.Z. et al. *Ozonioterapia em Medicina Veterinária*. São Paulo: Multimidia Editora, 1 ed, 282 p, 2018.

ZAMBRANO, C.G. et al. Óleo de girassol ozonizado: atividade anti-*Pythium insidiosum*. *Revista Brasileira de Medicina Equina*, v.13, n. 84, p. 18-20, 2019