

Suscetibilidade in vitro do oomiceto *Pythium insidiosum* ao óleo essencial de *Mentha piperita*

Anelise Oliveira da Silva Fonseca¹; Fernando Maia Filho²; Julia Silveira de Souza Valente³; Beatriz Persici Maroneze⁴; Daniela Isabel Brayer Pereira⁵; Mario Carlos Araujo Meireles⁶

¹ Universidade Federal de Pelotas – anelise_fonseca@yahoo.com.br

² Universidade Federal de Pelotas – fmaia2404@yahoo.com.br

³ Universidade Federal de Pelotas – juliassilveira@gmail.com

⁴ Universidade Federal de Pelotas – beatrizpersici@ibest.com.br

⁵ Universidade Federal de Pelotas – danielabrayer@gmail.com

⁶ Universidade Federal de Pelotas – meireles@ufpel.edu.br

1. INTRODUÇÃO

Oomicetos do gênero *Pythium* são, classificados no Reino Stramenipila. Na sua maioria são habitantes do solo e patógenos de plantas, causando sérios prejuízos na produção agrônômica (ALEXOPOULOS, 1996). Dentre as espécies identificadas, apenas *Pythium insidiosum* é capaz de infectar mamíferos que habitam regiões tropicais e subtropicais. Afeta principalmente equinos, caninos e humanos, levando ao desenvolvimento de uma enfermidade grave, de prognóstico desfavorável e difícil tratamento, conhecida como pitiose. Dependendo da espécie afetada a doença pode ser manifestar na forma cutânea, gastrointestinal, oftálmica e sistêmica (GAASTRA et al., 2010).

O sucesso das diferentes formas de terapia (cirurgia, imunoterapia e agentes antimicrobianos) é variável. A cirurgia continua sendo o método mais popular e mais frequentemente utilizado no tratamento da pitiose em animais e no homem, todavia, altas taxas de recidiva (45%) são observadas. A imunoterapia surgiu como uma alternativa para o tratamento da pitiose equina e tem sido utilizada por mais de 20 anos (GAASTRA et al., 2010). Embora seja considerada uma prática segura, com índices de cura de aproximadamente 60% em equinos e humanos, há muitos casos não responsivos e em algumas espécies como cães e gatos os resultados são desapontadores (MENDOZA e NEWTON, 2005).

Nos últimos anos, vários estudos in vitro têm sido desenvolvidos no intuito de avaliar a susceptibilidade de isolados de *P. insidiosum* a diferentes fármacos antifúngicos, incluindo derivados azólicos, anfotericina B, terbinafina (ARGENTA et al., 2008; CAVALHEIRO et al., 2009), caspofungina (PEREIRA et al., 2007) e mais recentemente aos antimicrobianos macrolídeos e tetraciclina (LORETO et al., 2011). Mesmo que esses estudos demonstrem susceptibilidade dos isolados de *P. insidiosum* aos fármacos testados, os dados de terapia clínica têm evidenciado falhas da terapia antifúngica (KRAJAEJUN et al., 2006). A ausência de ergosterol na membrana citoplasmática dos Stramenopilan micro-organismos explica as dificuldades com terapias antifúngicas, tendo em vista que o ergosterol é o sítio alvo da maioria dos antifúngicos disponíveis e mais comumente utilizados (GAASTRA et al., 2010). Desta forma, pesquisas que visam a busca de novas alternativas de tratamento para pitiose são crescentes e incessantes.

A utilização de óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas como agentes de controle de doença tem sido foco de muitos estudos, uma vez que tendem a apresentar baixa toxicidade as células dos mamíferos, menor impacto ambiental e boa aceitação do público. Suas atividades antimicrobianas frente a

bactérias, fungos, insetos e nematódeos são bem conhecidas e decorrem da presença de substâncias químicas bioativas, comumente usadas como fragrâncias e aromatizantes de alimentos e bebidas (LEE et al., 2007).

O presente estudo teve como objetivos avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* ao óleo essencial de *Mentha piperita*.

2. METODOLOGIA

Isolados de *Pythium insidiosum*: Quinze isolados de *P. insidiosum* oriundos de equinos com pitiose foram utilizados para a preparação dos inóculos e posterior testes de suscetibilidade.

Preparação dos inoculo: compreendeu uma suspensão de 20.000 – 30.000 zoósporos/mL de *P. insidiosum*, obtidos por meio da técnica de zoosporogênese, como previamente descrito e padronizado por Pereira et al. (2007). Após foi diluída 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165 M de MOPS.

Para os testes *in vitro* foi realizada a técnica de microdiluição em caldo, em triplicata, de acordo com as normas descritas no documento M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) adaptado para fitofármacos. O óleo foi diluído em RPMI com adição de 10µL de Tween 80, nas diluições que variaram de 14 a 0,025mg/mL. Foram então incubadas a 37°C por 48 horas. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), definida como a menor concentração em que não houve o crescimento de hifas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A susceptibilidade *in vitro* dos quinze isolados de *P. insidiosum* frente ao óleo essencial de *M. piperita* está listada na tabela 1.

Isolados	CIM	CFM
CBS101555	0,87	0,87
PI 001/09	0,87	0,87
PI 003/09	0,87	0,87
PI 004/09	0,87	0,87
PI 008/09	1,75	1,75
PI 009/10	1,75	1,75
PI 011/10	3,5	3,5
PI 012/10	0,11	0,11
PI 014/10	0,22	0,22
PI 017/10	0,44	0,44
PI 020/11	0,44	0,44
PI 022/12	0,87	0,87
PI 023/12	0,87	0,87
PI 025/13	0,22	0,22
PI 026/13	0,22	0,22

Foi observado que 39,96% dos isolados testados evidenciaram MICs de 0,87 ml/mL ao óleo, assim como o MIC 50 é 1,75mg/mL e o MIC 90 é 1,75mg/mL.

Contrário aos resultados obtidos em nosso estudo Lee et al (2007) não observou atividade do óleo essencial de *M. piperita* quando testado frente *Pythium ultimum*. Estas divergências de susceptibilidade podem ser decorrentes da origem e constituição do óleo utilizado, assim como de diferenças na susceptibilidade das espécies de *Pythium* avaliadas. Outro fator que poderia influenciar os resultados obtidos diz respeito à técnica de microdiluição em caldo utilizada em nosso estudo, uma vez que a mesma não está padronizada para testes com óleos essenciais. Entretanto, essa técnica tem sido utilizada em outros estudos para avaliar a sensibilidade de isolados fúngicos frente a óleos essenciais, sendo considerada de fácil execução, reprodutível e segura (CLEFF et al., 2010).

Nossos resultados são compatíveis aos obtidos por Tyagi e Malik (2011), com outras espécies fungicas, onde foi observado MICs entre 2,25 a 1,13mg/ml.

Agentes antifúngicos que interferem com a biossíntese de ergosterol como azólicos, terbinafina e anfotericina B causam a lise celular de fungos, pois atuam alterando a permeabilidade da membrana celular. Porém, estes fármacos apresentam pouco ou nenhum efeito sobre *P. insidiosum*, uma vez que estes Stramenopilan micro-organismos carecem de ergosterol em suas membranas (GAASTRA et al., 2010). Sugere-se que a atividade dos óleos essenciais de orégano e alecrim sobre os isolados de *P. insidiosum* avaliados no presente estudo podem ter sido decorrentes de alterações da permeabilidade da membrana citoplasmática, que determinam modificações no gradiente de íons de hidrogênio, potássio e cálcio e produzem deterioração de processos essenciais à sobrevivência das células, tais como o transporte de elétrons, transporte de proteínas, interferência na fosforilação, entre outros (RAO et al., 2010). Entretanto, estudos para esclarecer e comprovar tal mecanismo são necessários.

O presente estudo, além de evidenciar promissora atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mentha piperita* sobre *P. insidiosum*, alerta para o potencial uso de óleos essenciais de plantas como agentes de controle destes importantes micro-organismos. Todavia, estudos in vitro que avaliem um maior número de isolados de *P. insidiosum*, assim como estudos in vivo são necessários para viabilizar a utilização dos óleos essenciais de alecrim e orégano na pitiose animal.

4. CONCLUSÕES

O presente estudo, além de evidenciar promissora atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. piperita* sobre *P. insidiosum*, alerta para o potencial uso de óleos essenciais de plantas como agentes de controle destes importantes micro-organismos. Todavia, estudos in vitro que avaliem um maior número de isolados de *P. insidiosum*, assim como estudos in vivo são necessários para viabilizar a utilização dos óleos essenciais de alecrim e orégano na pitiose animal.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXOPOULOS, C.J.; Mims, C.W.; Blackwell, M. In: **Introductory Mycology** New York: John Wiley, Sons, 1996.
- GAASTRA W, LIPMAN L J A, DE COCK A W A M, EXEIT K, PEGGE R B G, SCHEURWATER J; VILELA, R.; MENDOZA, L.. *Pythium insidiosum*: An overview. **Veterinary Microbiology**; v.146, p.1- 16. 2010.
- MENDOZA, L. e NEWTON, J. C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum* **Medical Mycology**; v.43, p.477-486. 2005.
- ARGENTA, J. S.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; PEREIRA, D. I. B.; CAVALHEIRA, A. S.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, p.767–769, 2008.
- CAVALHEIRO, A. S.; ZANETTE, A. R., SPADER, T. B.; LOVATO, L.; AZEVEDO, M. I.; BOTTON, S.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen agent *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v.137, p.408-411, 2009.
- PEREIRA, D. I. B.; SANTURIO, J. M.; ALVES, S. H.; ARGENTA, J. S.; POTTER, L.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.60, p.1168–1171, 2007.
- LORETO, E. S.; MARIO, D. A. N.; DERNARDI, L. B.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.55, p.3588 – 3590, 2011.
- KRAJAEJUN, T.; SATHAPATAYAVONGS, B.; PRACHARKTAM, R.; NITIYANANT, P.; LEELACHAIKUL, P.; WANACHIWANAWIN, W. et al. Clinical and Epidemiological analyses of human Pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Disease**. v. 43, p. 569-576, 2006.
- LEE, S.O., CHOI, G.J.C., JANG, K.S., LIM, H.K., CHO, K.Y., KIM, J.C., Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. **The Plant Pathology Journal**, v. 23, n. 2, p. 97-102, 2007.
- CLEFF, M.B; MEINERZ, A. R.; XAVIER, M.; SCHUCH, L. F., MEIRELES, M. C. A.; RODRIGUES, M. R. A.; MELLO, J. R. B. In vitro susceptibility of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 116-123, 2010.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution 143 antifungal susceptibility testing of filamentous fungi : approved standard, 2nd ed. M38-A2. CLSI, 144 Wayne, PA, 2008.
- RAO, A.; ZANG, V.; MUEND, S.; RAO, R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.54, p.5062-5069, 2010.
- TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour against food spoiling microorganisms. **Food Control**. v.22, p.1707-1714, 2011.