

## POTENCIAL DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO® NA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO MICELIAL DE *Pythium insidiosum*: RESULTADOS PARCIAIS DE UMA AVALIAÇÃO *ex vivo*

ANA LOPES DE ANDRADE SARAIVA<sup>1</sup>, CAROLINE QUINTANA BRAGA<sup>2</sup>,  
CRISTINA GOMES ZAMBRANO<sup>3</sup>, JEFERSON LUIZ SILVA DE SOUZA<sup>4</sup>,  
ISABELLA RODRIGUES DE ANDRADE<sup>5</sup>, DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA<sup>6</sup>

<sup>1</sup> Universidade Federal de Pelotas - ana.lopessaraiva1999@gmail.com

<sup>2</sup> Universidade Federal de Pelotas - carolineqbraga@hotmail.com

<sup>3</sup> Universidade Federal de Pelotas - cris-zambrano@hotmail.com

<sup>4</sup> Universidade Federal de Pelotas - jefersonluizsds@gmail.com

<sup>5</sup> Universidade Federal de Pelotas - andradeisabella52@gmail.com

<sup>6</sup> Universidade Federal de Pelotas - danielabraye@gmail.com

### 1. INTRODUÇÃO

*Pythium insidiosum* é um oomiceto aquático e agente etiológico da pitiose, uma doença que acomete mamíferos, sendo frequentemente relatada em humanos na Índia e Tailândia, e em equinos no Brasil (GAASTRA et al., 2010, YOLANDA & KRAJAEJUM et al., 2022).

A pitiose equina é uma enfermidade de rápida progressão e caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões granulomatosas, ulcerativas no tecido cutâneo e subcutâneo (GAASTRA et al., 2010). No interior da lesão, observa-se abundante tecido conjuntivo fibroso com presença de massas branco-amareladas, denominadas *kunkers* (GAASTRA et al., 2010; CHAFFIN et al., 1995). A presença de *kunkers* além de auxiliarem no diagnóstico da enfermidade em equinos, também desempenham papel importante na contaminação de águas por *P. insidiosum*, uma vez que ao se desprenderem naturalmente das lesões e em condições favoráveis de temperatura e águas estagnadas, refazem o ciclo do oomiceto, mantendo a re-contaminação dos ambientes aquáticos (FONSECA et al., 2014).

*P. insidiosum* difere dos fungos verdadeiros, pois não possui ergosterol em sua membrana citoplasmática, como também apresenta uma via incompleta de biossíntese de esteróis. Com isso, as terapias com antifúngicos que atuam na membrana inibindo a síntese de ergosterol têm se mostrado ineficientes frente a este eucarioto patógeno (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Sendo assim, a pitiose destaca-se pelo prognóstico desfavorável, letalidade nas espécies afetadas e dificuldades de tratamento. Desta forma, nas últimas décadas houve um incremento das pesquisas que buscaram novos protocolos terapêuticos, incluindo estudos com compostos naturais e sintéticos com atividade *anti-P.insidiosum* (FONSECA et al., 2015; IANISKI et al., 2021; VALENTE et al., 2019; YOLANDA & KRAJAEJUM et al., 2022), bem como terapias inovadoras e integrativas, incluindo a ozonioterapia (ZAMBRANO et al., 2019; FERREIRA et al., 2021).

A ozonioterapia tem sido empregada como uma terapia integrativa no tratamento de diversas enfermidades infecciosas que acometem animais e humanos. O ozônio pode ser administrado por via sistêmica e local, podendo nesta última ser utilizado como óleo ozonizado (SCIORSI et al., 2020).

O objetivo deste estudo foi verificar a inibição *in vitro* do crescimento de *P. insidiosum* a partir de *kunkers* expostos ao óleo de girassol ozonizado® (OGO).

## 2. METODOLOGIA

As três amostras de *kunkers* utilizadas neste estudo foram obtidas de equinos (n=3) com pitiose cutânea/subcutânea e foram encaminhadas ao laboratório de micologia (LabMico/IB/UFPEl) para isolamento e identificação de *P. insidiosum*. O óleo de girassol ozonizado® (OGO) utilizado neste estudo foi cedido pela empresa Philozon. Para o ensaio, os *kunkers* foram cortados em pequenos pedaços e lavados por 20 minutos em solução antibiótica contendo penicilina G benzatina (10.000.000 UI), penicilina G procaína (10.000.000 UI) e diidroestreptomicina (20 g) (FONSECA et al., 2014). Em seguida, foram lavados em água destilada estéril e 10 pedaços foram transferidos para placas de Petri contendo ágar levedura 0,1%. Nas placas tratamento, a superfície de cada fragmento de *kunker* foi recoberta com 50 µL de OGO; nas placas controle os fragmentos de *kunkers* não receberam o OGO. Todas as placas foram incubadas a 37°C/96 horas. As placas foram observadas diariamente e a leitura foi realizada ao final do tempo de incubação e considerou o crescimento micelial de *P. insidiosum* a partir dos *kunkers*. O ensaio foi realizado em duplicata.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas condições em que esse estudo foi realizado, observou-se abundante crescimento micelial de *P. insidiosum* a partir dos fragmentos de *kunkers* sem OGO (controle) em 48 horas de incubação (Figura 1 (A)). Por outro lado, o crescimento do oomiceto a partir dos fragmentos de *kunkers* tratados com o óleo ozonizado foi completamente inibido (Figura 1 (B)). Resultados similares foram relatados por ZAMBRANO et al. (2019) ao avaliarem a ação do óleo de girassol ozonizado sobre uma amostra de *kunker*. Previamente, FERREIRA et al. (2021) e CARRIJO et al. (2022) também evidenciaram a atividade anti-*P. insidiosum* do óleo de girassol ozonizado. Contudo, estes ensaios foram realizados empregando cultivo micelial de *P. insidiosum*.

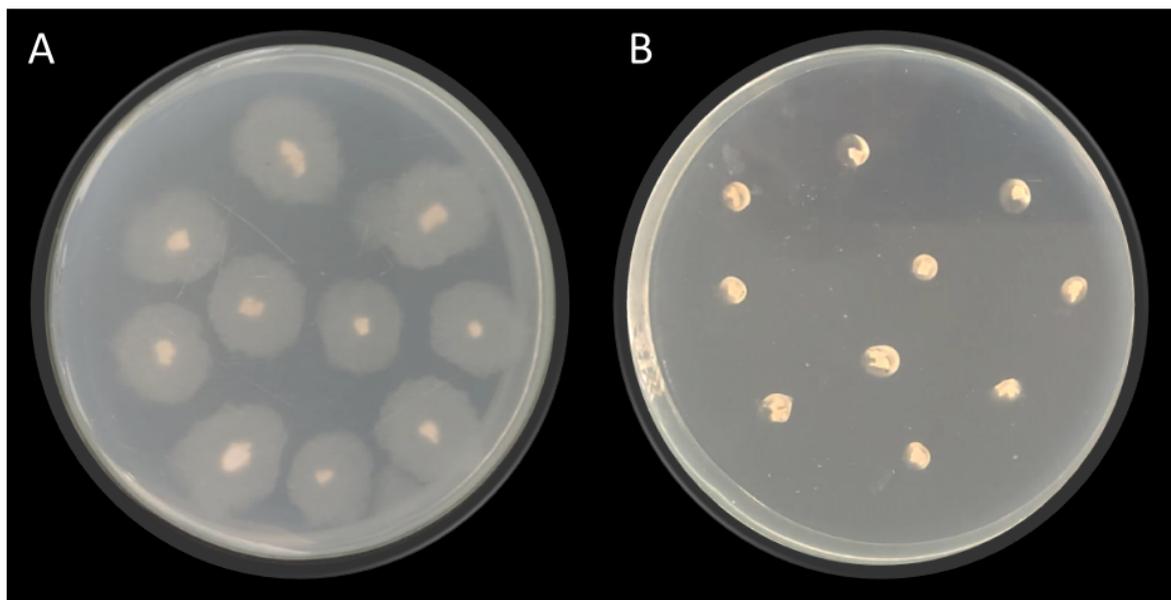


Figura 1: Ensaio de suscetibilidade *in vitro*: (A) observa-se abundante crescimento micelial de *P. insidiosum* (controle – sem tratamento com o óleo de girassol ozonizado®); (B) evidencia-se a ausência de crescimento do micélio do oomiceto (tratamento com o óleo de girassol ozonizado®). Agar levedura 0,1%/ 96 horas de incubação/37°C.

Cabe salientar que os *kunkers* são formados no interior das lesões de pitiose equina e são constituídos por agrupamentos viáveis de hifas de *P. insidiosum* recobertas por células inflamatórias que protegem o micro-organismo (MENDOZA et al., 1996). Sendo assim, os resultados obtidos permitem inferir que o uso tópico integrativo do OGO em feridas cutâneas de pitiose em equinos pode ser um excelente aliado para a recuperação das lesões.

A propriedade antimicrobiana do óleo de girassol é potencializada pela ozonização. A molécula de ozônio reage com os triglicerídeos insaturados presentes na composição do óleo, dando origem a uma série de espécies de peróxidos, os quais são responsáveis pela ampla atividade biológica do óleo ozonizado (KOGAWA et al., 2015; RODRÍGUEZ et al., 2018). O OGO possui diversas aplicações e tem sido muito usado na medicina veterinária por ser um potente oxidante e um potencial agente terapêutico no processo de cicatrização, visto que estimula a proliferação celular e tecidual. Além disso a utilização dos óleos vegetais ozonizados é eficaz e absolutamente atóxica, quando empregada em dosagens que induzem apenas o estresse oxidativo (RODRÍGUEZ et al., 2018; UGAZIO et al., 2020, BORRELLI & BOCCI 2018).

#### 4. CONCLUSÕES

Neste estudo demonstrou-se que o óleo de girassol ozonizado® (OGO) é capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* a partir de *kunkers* oriundos de lesões de pitiose em equinos. Este resultado sugere que esta formulação pode ser uma potente aliada da medicina integrativa a ser empregada na terapia da pitiose em equinos. Contudo, a continuidade das pesquisas avaliando um maior número de *kunkers*, bem como o uso do óleo ozonizado no tratamento de lesões clínicas de pitiose em equinos são requeridas para validar a ação do óleo de girassol ozonizado no tratamento desta importante enfermidade.

#### 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BORRELLI E, BOCCI V. The Use of Ozone in Medicine. **Ann Med Health Sci Res**, v.8, p. 117-119, 2018.

CARRIJO, B. N. et al. Ozone Gas and Ozonized Sunflower Oil as Alternative Therapies against *Pythium Insidiosum* Isolated from Dogs. **Ozone: Science & Engineering**, v.44, n. 4, p. 98–406, 2022.

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.

FONSECA, A.O. 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, 2015.

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.

IANISKI, L. B. et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of amorolfine hydrochloride and azithromycin, alone and in combination. **Medical Mycology**, v.59, n. 1, p. 67–73, 2021.

KOGAWA N.R.A. et al. Synthesis, characterization, thermal behavior, and biological activity of ozonides from vegetable oils. **RSC Adv** v.5, p. 65427–65436, 2015.

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

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

SCIORSI, R.L. et al. Ozone therapy in veterinary medicine: A review. **Research in Veterinary Science** v.130, p. 240-246, 2020.

UGAZIO, E. et al. Ozonated Oils as Antimicrobial Systems in Topical Applications. Their Characterization, Current Applications, and Advances in Improved Delivery Techniques. **Molecules**, v.25, n.2, 2020.

VALENTE J.S.S. et al. *In vitro* anti- *Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v.57, n.7, p. 858–863, 2019.

YOLANDA, H. & KRAJAEJUN T. Global Distribution and Clinical Features of Pythiosis in Humans and Animals. **Journal of Fungi**. v.8, n.182, 2022.

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.