

Atividade *in vitro* e *ex vivo* de nano partículas de prata sobre *Pythium insidiosum*

WALDENIS PEREIRA DA TRINDADE JUNIOR¹; CAROLINA DOS SANTOS BERMANN¹; CAROLINA LITCHINA BRASIL¹; CAROLINE QUINTANA BRAGA¹; JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA VALENTE¹; DANIELA ISABEL BRAYER PEREIRA²

¹Universidade Federal de Pelotas – waldenis.junior@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – danielabraye@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Pythium insidiosum é um oomiceto patogênico e agente etiológico da pitiose em mamíferos. A enfermidade apresenta maior ocorrência em regiões de clima tropical e subtropical (GAASTRA, 2010), sendo o Brasil e a Tailândia endêmicos para pitiose em equinos e humanos, respectivamente. A pitiose equina caracteriza-se por ser uma doença crônica que pode se apresentar na forma cutânea e subcutânea, com rápida progressão e presença de tecido de granulação exuberante. No interior da lesão observam-se estruturas ramificadas (hifas) recobertas por reação inflamatória, sendo conhecidas com a denominação de *kunkers* (GAASTRA et al., 2010; CARDONA ALVAREZ, 2013).

Fármacos com atividade antifúngica são pouco eficientes contra *P. insidiosum*, pois a membrana plasmática desse micro-organismo carece de ergosterol, sítio-alvo da maioria das drogas antifúngicas de uso clínico (LUIS-LEON, 2011). Embora haja tratamento para enfermidade, as terapias disponíveis nem sempre são eficazes e os custos com os tratamentos são elevados (SANTURIO, 2001).

Diante das peculiaridades deste oomiceto, e devido ao fato da doença ser de rápida evolução, prognóstico desfavorável e elevadas taxas de mortalidade nas espécies afetadas, pesquisadores vêm desenvolvendo diversos estudos empregando princípios ativos naturais ou metálicos e drogas antimicrobianas em busca de um tratamento eficaz (RIBEIRO et al., 2017; LORETO et al., 2018; VALENTE et al., 2016).

Nanopartículas de prata (AgNP) possuem propriedades antimicrobianas contra bactérias, leveduras, algas e alguns fungos (CARLSON et al., 2008; FABREGA et al., 2011). Adicionalmente, a literatura aponta o uso de AgNP em formulações antimicrobianas com ação sobre micro-organismos causadores de infecções resistentes (SZYMAŃSKA et al., 2018; VALENTE et al., 2018).

Levando em consideração as propriedades de AgNP, o presente trabalho verificou a atividade antimicrobiana *in vitro* e *ex vivo* de uma nanopartícula biogênica de prata (bio-AgNP) frente a isolados brasileiros de *P. insidiosum*.

2. METODOLOGIA

Para a realização dos testes foram utilizados dez isolados de *P. insidiosum* pertencentes ao Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia/ UFPel. A nanopartícula biogênica de prata (bio-AgNP) foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Microbiologia Médica e Microbiologia Bucal da Universidade Estadual de Londrina. A formulação da bio-AgNP foi preparada de acordo com o método descrito e patenteado por DURÁN et al. (2005; 2006), com adaptações. Este método basicamente consiste na redução de nitrato de prata por *Fusarium oxysporum*.

Os testes de microdiluição *in vitro* foram realizados segundo o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008) com adaptações. O inóculo foi formulado conforme previamente descrito por Fonseca et al. (2014). A bio-AgNP foi diluída em meio RPMI e as concentrações testadas variaram de 0,0075 a 3,76 µg/mL. As placas foram incubadas a 37°C sob agitação constante (70RPM) 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/48 horas. A menor concentração da bio-AgNP que não evidenciou crescimento foi considerada a COM. Os testes foram realizados em quadruplicata.

Para os testes *ex vivo*, concentrações de 0,47µg/mL (P1); 235 µg/ml (P2); e 470 µg/mL (P3) de bio-AgNP foram incluídas em uma pomada-gel em base não iônica. *Kunker* (n=1), oriundo de doença clínica em um equino foi previamente cortado em pequenos fragmentos e lavado em água destilada estéril com antibióticos. Em seguida seis fragmentos do tecido foram distribuídos em placas de petri contendo agar levedura. Sobre os fragmentos de *kunker* foi adicionado 1g da pomada em cada concentração avaliada (P1, P2 e P3). Nas placas de controle para o crescimento do micro-organismo não foi adicionado pomada. Todos os tratamentos foram realizados em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C/48 horas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As concentrações de bio-AgNP que inibiram o crescimento dos dez isolados de *P. insidiosum* avaliados variaram de 0,06 a 0,24µg/mL. Verificou-se que a CIM₅₀ (concentração inibitória mínima capaz e inibir 50% dos isolados) e a CIM₉₀ (concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados) foi de 0,24µg/mL.

Estudos prévios evidenciaram o potencial antimicrobiano das AgNP, sendo aplicadas em diversas áreas, principalmente, na indústria farmacêutica (INGLE et al., 2014; RAI et al., 2009). As AgNPs são empregadas na forma de cremes ou soluções de nitrato de prata, sendo utilizadas na prevenção de queimaduras, feridas e úlceras, pela sua capacidade de acelerar o processo de cicatrização (WU et al.,2014).

No presente estudo demonstrou-se que a formulação de bio-AgNP empregada apresentou relevante atividade antimicrobiana frente ao oomiceto *P. insidiosum*, com CIM variando entre 0,06 µg/mL a 0,24µg/mL. Esses resultados foram similares aos de Xu et al. (2013), que relataram CIM de 0,0625 µg/mL a 1µg/mL de AgNP contra fungos causadores de ceratites oculares, incluindo espécies de *Aspergillus* e *Alternata alternata*.

Os fragmentos de *kunker* tratados com a pomada-gel P2 (235 µg/mL de bio-AgNP) e P3 (470µg/mL de bio-AgNP) não apresentaram crescimento micelial de *P. insidiosum*, entretanto no tratamento com a pomada P1 (0,47 µg/mL de bio-AgNP) observou-se crescimento do micro-organismo, similar ao controle (sem pomada).

Em estudo prévio, Valente et al. (2018) demonstraram por microscopia eletrônica de transmitância e varredura que a bio-AgNP induz a alterações na superfície das hifas de *P. insidiosum* com retração e perda de continuidade na parede celular,

bem como evidenciaram o desaparecimento de organelas intracitoplasmáticas, comprovando a atividade anti- *P. insidiosum* desse composto. Neste trabalho, constatou-se que a bio-AgNP é capaz de inibir o crescimento do oomiceto a partir do *kunker* em concentrações maiores que a CIM₉₀. No entanto, este experimento foi realizado empregando apenas um *kunker* oriundo de pitiose clínica. Desta forma, um maior número de *kunkers*, bem como a avaliação de outras concentrações de bio-AgNP na pomada-gel, são necessários para determinar-se a atividade *ex vivo* dessa formulação contendo bio-AgNP.

4. CONCLUSÕES

A formulação de bio-AgNP avaliada no presente estudo apresenta relevante atividade anti-*P. insidiosum* e pode ser considerada como potencial aliada na terapia da pitiose. Entretanto, apesar dos avanços realizados no tratamento da pitiose, é visível a necessidade de mais estudos e pesquisas adicionais com o objetivo de verificar e avaliar o uso de associações entre as terapias disponíveis.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

CARDONA ALVAREZ, José; VARGAS VILORIA, Marlene; PERDOMO AYOLA, Sandra. Pitiose cutânea em equinos: uma revisão. **Ces. Med. Vet. Zootec.**, Medellín, v. 8, n. 1, p. 104-113, Jan. 2013.

CARLSON, C., HUSSAIN, S.M., SCHRAND, A.M., K. BRAYDICH-STOLLE, L., HESS, K.L., JONES, R.L., SCHLAGER, J.J., 2008. Unique cellular interaction of silver nanoparticles: size-dependent generation of reactive oxygen species. **The Journal of Physical Chemistry B** 112 (43), 13608e13619.

DURÁN N, MARCATO PD, ALVES OL, SOUZA GI, ESPOSITO E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **J. Nanobiotechnology**. V.3, p:1-7, 2005.

DURÁN, N., *et al.* Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e o tratamento dos efluentes produzidos. Braz. patent PI 0605681-4 A. **Campinas: BR. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI)**, 2006.

FABREGA, R. Samuel Luoma, S. Charles Tyler, R. Tamava Galloway, Jamie, Silver nanoparticles behaviour and effects in the aquatic environment. **Environment international**, 37, 517-531, 2011.

FONSECA *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, jun. 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.

INGLE A.P., *et al.* Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.1001-1009, 2014.

LORETO E. S. et al. *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.3, p.1678-1717, 2018.

LUIS-LEON, Juan J; PEREZ, Rosa Cristina. Pythiosis: Una patología emergente en Venezuela. *Salus*, Valencia , v. 15, n. 1, p. 38-45, abr. 2011.
Nasrollahi A, Pourshamsian Kh, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. **Int.J.Nano.Dim** 2011; 1: 233-239.

RAI M., et al. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, p.76-83, 2009.

RIBEIRO TC, et al. *In vitro* susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc. **Medical Mycology**,v. 55,p.669-672,2017.

SANTURIO, J.M. et al. Tratamento imunoterápico da Pitiose Equina. **EMBRAPA, gado de corte** – Comunicado técnico, n.67, 2001.

SZYMAŃSKA E, Orłowski P, Winnicka K et al. Multifunctional Tannic Acid/Silver Nanoparticle-Based Mucoadhesive Hydrogel for Improved Local Treatment of HSV Infection: *in vitro* and *in vivo* studies. **Int J Mol Sci**. v.19, p.1-21, 2018.

VALENTE J.S.S. In Vitro Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**. 2016.

VALENTE, J.S.S. et. al. Braga. *In vitro anti-Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**. 2018.

Wu J, Zheng. et al. In situ synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. **Carbohydr Polym**. v.15,n.102,p:762-71, 2014.

Xu Y. et al. In Vitro Antifungal Activity of Silver Nanoparticles Against Ocular Pathogenic Filamentous. **fungi journal of ocular pharmacology and therapeutics** v.29, n. 2, p:270-274, 2013.