

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Parasitologia
Programa de Pós - Graduação em Parasitologia



Dissertação

Atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* isolados, combinados entre si e com antifúngicos, frente ao oomiceto *Pythium insidiosum*

Júlia de Souza Silveira

Pelotas, 2016

JÚLIA DE SOUZA SILVEIRA

Atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* isolados, combinados entre si e com antifúngicos frente ao oomiceto *Pythium insidiosum*

Dissertação de mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Parasitologia da Universidade Federal
de Pelotas

Orientador: Prof. Dr^a Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2016

Dados de catalogação na fonte:
Ubirajara Buddin Cruz – CRB 10/901
Biblioteca de Ciência & Tecnologia - UFPel

S587a Silveira, Júlia de Souza
 Atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* isolados, combinados entre si e com antifúngicos, frente ao oomiceto *Pythium insidiosum* / Júlia de Souza Silveira. – 100f. – Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas. Instituto de Biologia, 2016. – Orientadora Daniela Isabel Brayer Pereira.

 1.Parasitologia. 2.Árvore-do-chá. 3.Hortelã. 4.Orégano.
 5.Itraconazol. 6.Terbinafina. I.Pereira, Daniela Isabel Brayer.
 II. Título.

CDD: 661.806

Júlia de Souza Silveira

Atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* isolados, combinados entre si e com antifúngicos frente ao oomiceto *Pythium insidiosum*

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 15/02/2016

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientadora). Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Patrícia da Silva Nascente. Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Sônia de Avila Botton. Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Dr^a Luiza da Gama Osório. Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Dr^a Anelise de Oliveira da Silva Fonseca. Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

A Deus pela vida e por me guiar nesse árduo caminho da vida.

A minha família pela educação, pelo incentivo, e por me ensinarem a acreditar no meu potencial e nunca desistir diante das dificuldades.

Ao meu esposo por todo apoio, incentivo, compreensão e por amparar o meu estresse diante das crises.

A minha querida orientadora professora Dr^a. Daniela Pereira por me ensinar desde os primeiros passos na iniciação científica até a pós-graduação sempre me incentivando e exigindo minha máxima dedicação durante esse percurso durante esses seis anos de convívio e amizade.

Ao nosso grupo de pesquisa que me ofereceu todo o apoio sem medir esforços, além das amizades construídas ao longo de nosso convívio e por me ensinar o valor do trabalho em equipe.

Ao professor Dr. Sydney Hartz Alves por se colocar à minha disposição no aprendizado da metodologia aplicada no presente estudo.

À minha querida amiga Laura Bedin Denardi da Universidade Federal de Santa Maria por me ensinar pacientemente as técnicas de combinações de fármacos e os cálculos envolvidos apesar de todas as minhas dificuldades.

À professora Dr^a. Sônia de Avila Botton pelo apoio nas correções dos artigos.

As minhas amigas Giordana Perez e Andreza Maciel pelo apoio moral e psicológico.

À Universidade Federal de Pelotas por toda a minha formação acadêmica desde a graduação até a pós-graduação.

Ao Programa de Pós-graduação em Parasitologia e todos os professores integrantes que contribuíram com o conhecimento científico.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro.

Resumo

VALENTE, Júlia de Souza Silveira. **Atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* isolados, combinados entre si e com antifúngicos, frente ao oomiceto *Pythium insidiosum***. 2016. 100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia) - Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pythium insidiosum causa pitiose, uma doença grave e emergente que acomete os mamíferos. As falhas com as terapias antifúngicas convencionais é, em parte, justificada pela ausência do ergosterol na composição de membrana citoplasmática deste oomiceto. Apesar do avanço das pesquisas, o tratamento da pitiose ainda não está completamente estabelecido. Neste trabalho verificou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* de *Melaleuca alternifolia*, na forma de óleo livre e em nanoemulsão frente ao oomiceto *P. insidiosum* (n=26). Adicionalmente, investigou-se o perfil da suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente aos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*, em suas combinações e combinados com itraconazol ou terbinafina. Os testes de suscetibilidade foram realizados conforme o protocolo M38-A2 e as combinações avaliadas pela técnica de microdiluição *cherkerboard*. Todos os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*, destacando-se a melhor atividade de *O. vulgare*. Observou-se efeito sinérgico e/ou indiferente para todas as combinações de óleos essenciais testadas, ressaltando-se a combinação de *M. piperita* e *O. vulgare* que resultou em 65% de sinergismo. Nas combinações dos óleos essenciais com itraconazol ou terbinafina, foi observado acentuado efeito sinérgico para todas as combinações com itraconazol, destacando-se a combinação com *M. alternifolia* que resultou em 95% de efeito sinérgico. As combinações de terbinafina com os óleos essenciais evidenciaram indiferença ou efeito antagônico. Este é o primeiro estudo *in vitro* que avaliou as combinações de óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* frente a isolados brasileiros de *P. insidiosum*. Os resultados obtidos permitem sugerir que a combinação de compostos bioativos oriundos de plantas entre si e/ou com fármacos antifúngicos podem constituir uma alternativa terapêutica a ser aplicada no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. Todavia, outras pesquisas são imprescindíveis para determinar novos protocolos terapêuticos envolvendo as combinações avaliadas.

Palavras-chave: árvore-do-chá, hortelã, orégano, itraconazol, terbinafina.

Abstract

VALENTE, Júlia de Souza Silveira. ***In vitro* Susceptibility of *Pythium insidiosum* in association of essential oils, their combinations and with antifungal agents.** 2016. 100f. Dissertação (Mestrado em Parasitologia)- Programa de Pós-Graduação em Parasitologia. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Pythium insidiosum causes pythiosis, a severe and emerging disease that affects mammals. The limitations involving the conventional antifungal therapies is in part justified by the absence of ergosterol in the plasma membrane of this oomycete. Despite the advancement of research, treatment of pythiosis is not fully established. In this study, *in vitro* antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* in free oil and nanoemulsion was tested against the oomycete *P. insidiosum* (n=26). Additionally, the profile of *in vitro* susceptibility of Brazilian isolates of *P. insidiosum* (n = 20) was verified to the essential oils of *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare*, isolated, in their combinations and combinations with itraconazole and terbinafine. Susceptibility tests were achieved following the M38-A2 document and all combinations were performed by checkerboard microdilution test. All evaluated essential oils presented antimicrobial activity against *P. insidiosum*. However, the best results were demonstrated using *O. vulgare*. It was observed synergistic effect and/or indifferent to all combinations of essential oils tested, emphasizing that the combination of *M. piperita* and *O. vulgare* resulted in 65% of synergism. In combinations of essential oils with itraconazole or terbinafine were observed marked synergistic effect for all combinations with itraconazole, especially the combination with *M. alternifolia*, which resulted in 95% synergistic effect. Combinations with terbinafine and essential oils showed indifference or antagonistic effect. This is the first study evaluating *in vitro* combination of essential oils of *M. alternifolia*, *M. piperita* and *O. vulgare* against Brazilian isolates of *P. insidiosum*. The results obtained suggest that the combination of bioactive compounds from plants among themselves and / or with antifungal drugs may provide an alternative therapy in the control of *P. insidiosum* infection. However, further studies are essential to determine new therapeutic protocols involving these proposed combinations.

Keywords: tea tree, mint, oregano, itraconazole, terbinafine.

Lista de Tabelas

Manuscrito 1

Tabela 1: *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* (n=26) against *M. alternifolia* in free oil (FO) and nanoemulsion (NE) formulations. 46

Manuscrito 2

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* (n=20) aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*..... 58

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (MA), *Mentha piperita* (MP) e *Origanum vulgare* (OV)..... 59

Manuscrito 3

Tabela 1: Perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (MA), *Mentha piperita* (MP) e *Origanum vulgare* (OV) com os fármacos antifúngicos itraconazol (ITR) ou terbinafina (TER)..... 75

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (MA), *Mentha piperita* (MP) e *Origanum vulgare* (OV) com os fármacos antifúngicos itraconazol (ITR) ou terbinafina (TER).....76

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química do itraconazol.	22
Figura 2: Estrutura química da terbinafina.	23
Figura 3: Rota de biossíntese do ergosterol onde atuam o itraconazol e a terbinafina.	24

Sumário

1 Introdução.....	10
2 Objetivos.....	12
2.1 Objetivo geral.....	12
2.2 Objetivos específicos.....	12
3 Revisão de Literatura.....	13
3. 1 <i>Pythium insidiosum</i> e pitiose	13
3.1.2 Histórico e taxonomia.....	13
3.1.2 <i>Pythium insidiosum</i>	15
3.1.3 Pitiose	16
3.2 Métodos terapêuticos	19
3.2.1 Antifúngicos	21
3.2.1.1 Itraconazol.....	22
3.2.1.2 Terbinafina	23
3.2.2 Óleos essenciais	24
3.2.2.1 Plantas da família Lamiaceae (<i>Mentha piperita</i> e <i>Origanum vulgare</i>).....	25
3.2.2.1 <i>Melaleuca alternifolia</i>	27
3.3 Nanoemulsões	27
3.4 Associações de antimicrobianos	28
4 Manuscrito 1.....	31
Abstract.....	33
Resumen.....	34
Introduction	35
Material and Methods	36

Results.....	38
Discussion.....	38
Conclusion.....	40
Funding	40
Acknowledgments.....	41
References	41
5 Manuscrito 2.....	47
Resumo.....	48
Abstract.....	49
Introdução.....	49
Material e Métodos.....	50
Resultados	52
Discussão	53
Conclusão	54
Referências	54
6 Manuscrito 3.....	60
Resumo.....	61
Abstract.....	62
Introdução.....	63
Material e Métodos.....	64
Resultados	66
Discussão	67
Conclusão	69
Referências	70
8 Conclusões.....	82
Referências bibliográficas.....	83

1 Introdução

Pythium insidiosum é o agente causador da pitiose em mamíferos (GAASTRA et al., 2010). Trata-se de um oomiceto aquático, classificado no reino Stramenopila, classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum*, sendo esta a principal espécie patógena para mamíferos (ALEXOPOULOS; MIMS; BLACKWELL, 1996; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996).

A pitiose é uma doença ulcerativa, granulomatosa e de difícil tratamento relatada frequentemente em mamíferos, atingindo principalmente equinos e caninos. Segundo Miller (1983) a pitiose é descrita em regiões alagadas ou pantanosas de clima tropical, subtropical e temperado.

Diversas terapias foram empregadas para o tratamento da pitiose em animais e no homem, incluindo imunoterapia, cirurgia e fármacos antifúngicos. Embora, em alguns casos, esses métodos apresentem responsividade, muitos são os insucessos. Parte das falhas terapêuticas com fármacos antifúngicos é explicada pelas características de *P. insidiosum* que diferem dos fungos verdadeiros, sobretudo na sua composição de membrana celular (LEAL et al., 2001). Dessa forma, as drogas antifúngicas são ineficientes e a maioria dos animais atingidos não sobrevive em decorrência da infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Contudo, esses fatores estimularam várias tentativas de tratamento e testes de susceptibilidade *in vitro*, as quais foram realizadas utilizando fármacos antifúngicos como anfotericina B, azólicos, compostos iodínicos, terbinafina, caspofungina, tigeciclina, equinocandinas, além de outros antimicrobianos como macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, entre outros, com resultados variáveis e muitas vezes incoerentes com os testes *in vivo* (MCMULLAN et al., 1977; ENGLISH; FROST, 1984; FOIL et al., 1984; BISSONETTE et al., 1991; CHAFFIN;

SCHUMACHER; HOOPER, 1992; SEKHON; PADHYE; GARG, 1992; MEIRELLES et al., 1993; TRISCOTT et al., 1993; SHENEP et al., 1998; DYKSTRA et al., 1999; JAEGER; ROTSTEIN; LAW, 2002; GROOTERS, 2003; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005; RIVIERRE et al., 2005; ARGENTA et al., 2010; LORETO et al., 2011, 2012; MAHL e al., 2012; DÓRIA et al., 2012; PEREIRA et al., 2007; 2013; LORETO et al., 2014; ZANETTE et al., 2015).

As propriedades farmacológicas das plantas medicinais, bem como seu mecanismo de ação justificam suas ações antimicrobianas, analgésicas, anestésicas, anti-inflamatórias e espasmolíticas (NASCIMENTO et al., 2000; BAKKALI et al., 2008). Estudos empregando plantas medicinais comprovaram o potencial antimicrobiano frente a vírus (MINAMI et al., 2003), bactérias (SAGAVE et al., 2015), parasitos (BALDISSERA et al., 2014), fungos (CLEFF et al., 2010ab) e oomicetos, incluindo *P. insidiosum* (SRIPHANA et al., 2013; SUTHWONG et al., 2014; FONSECA et al., 2015ab; JESUS et al., 2015b).

Combinações entre fármacos podem ser vantajosas, uma vez que a associação de dois compostos pode aumentar a taxa de morte microbiana, encurta a duração do tratamento e permite o uso de doses mais baixas de cada composto (ZHU; GILL- LAMAINERE; MÜLLER, 2004). Testes de suscetibilidade *in vitro* empregando a combinação de fármacos têm demonstrado resultados promissores quando testados frente ao oomiceto *P. insidiosum* (ARGENTA et al., 2008; 2012; CAVALHEIRO et al., 2009ab; JESUS et al., 2015a).

Recentemente, Jesus et al. (2015b) e Fonseca et al. (2015b) evidenciaram que a combinação de óleos essenciais entre si ou de compostos bioativos de plantas com diferentes fármacos antimicrobianos, incluindo antifúngicos podem se constituir numa vantagem terapêutica no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. Contudo, pesquisas adicionais são necessárias no intuito de avaliar a eficácia dos fitoterápicos *in vitro* e *in vivo* em infecções causadas por este importante patógeno, bem como investigar suas aplicações aliadas às técnicas existentes e às novas tecnologias desenvolvidas no ramo da farmacologia.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* isolados, combinados entre si e em suas combinações com os antifúngicos itraconazol ou terbinafina.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* ao óleo essencial de *M. alternifolia* na sua formulação de óleo livre e nanoemulsão;
- Verificar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* aos óleos essenciais das plantas da família Lamiaceae *M. piperita* e *O. vulgare*;
- Averiguar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente às seguintes combinações dos óleos essenciais: *M. alternifolia* com *M. piperita*, *M. alternifolia* com *O. vulgare* e *M. piperita* com *O. vulgare*;
- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* frente às combinações dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* em suas combinações com os antifúngicos itraconazol ou terbinafina.

3 Revisão de Literatura

3.1 *Pythium insidiosum* e pitiose

3.1.2 Histórico e taxonomia

A nomenclatura da pitiose, bem como a classificação e taxonomia de seu agente etiológico, *P. insidiosum*, sofreram algumas mudanças ao longo dos anos. A doença recebeu muitas denominações e seu agente foi reclassificado por diversas vezes pela sua similaridade morfológica com os fungos verdadeiros e suas peculiaridades na composição estrutural. Os primeiros diagnósticos de pitiose foram feitos por veterinários ingleses na Índia na metade do século XIX, os quais observaram doença granulomatosa cutânea crônica que denominaram “bursattee” (GROOTERS, 2003). Todavia, os diagnósticos eram bastante imprecisos por conta da similaridade das lesões de pitiose com as ocasionadas por habronemíase cutânea (MENDOZA; NEWTON, 2005). Sua etiologia fúngica foi proposta no final do século XIX por Smith (1884) e Drouin (1896) (apud SANTURIO, 2008) baseados em dados histopatológicos. Contudo, o primeiro isolamento desse organismo filamentoso só foi realizado no início do século XX na Indonésia por Haan e Hoogkamer (apud DE COCK *et al.*, 1987; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; MENDOZA; NEWTON, 2005), oriundo de granulomas subcutâneos em equinos. Os mesmos nomearam a doença de “hyphomycoses destruens”, entretanto não classificaram o agente etiológico. Sua classificação foi realizada em 1961 por Bridges e Emons, quando o micro-organismo foi isolado e identificado, recebendo o nome de *Hyphomyces destruens*. Os autores sugeriram que o micro-organismo isolado era um ficomiceto,

possivelmente do gênero *Mortierella*, baseados nas características morfológicas de hifa vegetativa.

Em 1974, Austwick e Copland classificaram o *Hyphomyces destruens* como um fungo componente da família *Pythiaceae*, ordem *Peronosporales*, gênero *Pythium* baseados na observação da produção de zoósporos biflagelados em isolados de equinos da Nova Guiné. No entanto, a primeira nomenclatura continuou a ser utilizada nas descrições da doença (MCMULLAN et al., 1977; MURRAY et al., 1978; GONZÁLEZ et al., 1979). No Japão, Ichitani & Amemiya (1980), comparando um isolado de equino com outras espécies de *Pythium*, através de suas características reprodutivas, identificaram o agente como *Pythium gracile*. De Cock et al. (1987), ao analisar isolados de equinos, caninos, bovinos e humanos originários de diferentes localidades concluíram que todos apresentavam as mesmas características, sendo então classificados como *Pythium insidiosum*. Concomitante a este estudo, Shipton (1987) analisando isolados provenientes de equinos na Austrália, propôs uma nova espécie, então denominada *Pythium destruens*.

Somente em 1989, por meio de provas sorológicas com anti-soros oriundos de coelhos e equinos infectados com *P. insidiosum* e *P. destruens* chegou-se a conclusão de que se tratava de uma única espécie, estabelecendo-se uma única nomenclatura para o agente etiológico da pitiose: *Pythium insidiosum* (MENDOZA; MARIN, 1989). Todavia, a sua classificação taxonômica continuou sendo discutida nos anos seguintes. Baseado em um estudo de Corliss (1994) sobre a classificação e características dos protistas, Mendoza, Ajello e McGinnis (1996) classificou *P. insidiosum* no reino Chromista, filo Pseudofungi, classe Oomycetes, ordem Pythiales e família *Pythiaceae*. Posteriormente, estudos de classificação fúngica, utilizando sistemática filogenética e análises moleculares, dividiram os organismos anteriormente classificados como fungos em três reinos: Fungi, Stramenipila e Protista (ALEXOPOULOS et al., 1996). De acordo com essa nova classificação, o agente etiológico da pitiose pertence ao reino Stramenipila, filo Oomycota, família *Pythiaceae*, gênero *Pythium* e espécie *insidiosum* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Em uma análise mais profunda, estudos utilizando a comparação por sequenciamento de ácidos nucleicos da subunidade do RNA ribossomal (rRNA), demonstraram que os eucariotos pertencentes ao filo Oomycota estavam filogeneticamente distantes dos membros do Reino Fungi (KWON-CHUNG, 1994). Segundo Santurio (2008) esse distanciamento taxonômico entre os oomicetos e os

fungos é evidenciado em nível celular, nos componentes de parede e membrana. Apesar de ser um micro-organismo de crescimento filamentoso (semelhante aos fungos) possui algumas peculiaridades em sua composição, como ausência de ergosterol como principal esteróide na membrana citoplasmática (GROOTERS, 2003) e parede composta por traços de celulose e β -glucana, estando a quitina ausente desta estrutura (Hendrix, 1964).

3.1.2 *Pythium insidiosum*

O gênero *Pythium* possui em torno de 140 espécies descritas, incluindo patógenos de plantas, mamíferos, algas, micoparasitas e espécies sapróbias. Habitam ecossistemas de água doce, salgada e ambiente terrestre (KAGEYAMA, 2014). Durante muitos anos *P. insidiosum* foi a única espécie reconhecida como patógeno para mamíferos (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Entretanto, o relato de um caso de infecção por *Pythium aphanidermatum* em um soldado do Afeganistão aponta que outras espécies do gênero podem ser patógenas para mamíferos (CALVANO et al., 2011).

Por pertencer ao filo Oomycota, *P. insidiosum* possui as seguintes características: reprodução sexuada oogâmica; reprodução assexuada com liberação de zoósporos biflagelados; parede celular composta por celulose, β -glucanas e hidroxiprolina; mitocôndria com crista tubular; talo diplóide; características moleculares e bioquímicas distintas, como uma rota alternativa para a síntese do aminoácido lisina (MOORE-LANDECKER, 1996; ALEXOPOULOS et al., 1996).

Segundo Santurio (2008) a identificação dos isolados de *P. insidiosum* pode ser realizada através do aspecto da colônia e nas características das hifas. Seu cultivo pode ser feito em uma variedade de meios de cultura. Em agar farinha de milho (CMA), apresenta colônias transparente ou esbranquiçadas e com curto micélio aéreo. Possui hifas cenocíticas, septos raramente observados, que variam entre 4 e 10 μ m (micrômetros) com ramificações perpendiculares laterais em ângulo reto (DE COCK et al., 1987; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). A reprodução assexuada pode ser induzida *in vitro* pelo cultivo do oomiceto em ágar e posterior incubação em solução rica em sais minerais (MENDOZA; PRENDAS, 1988). Mesmo

que as características morfológicas permitam a identificação de *P. insidiosum*, técnicas moleculares são fundamentais para a classificação final da espécie. Entre as técnicas, destaca-se a PCR (Reação de Polimerase em Cadeia) e também o sequenciamento de DNA, o qual consiste no sequenciamento gênico pela amplificação parcial da região ITS1 do RNA ribossomal, considerada uma ótima ferramenta para a identificação deste micro-organismo (GROOTERS; GEE 2002).

3.1.3 Pitiose

A pitiose é uma doença piogranulomatosa que atinge mamíferos determinando infecções cutâneas/subcutâneas (equinos, caninos, felinos, bovinos, ovinos, caprinos e homem), gastrointestinais (caninos, felinos) e sistêmicas (homem) (GAASTRA et al., 2010, DO CARMO et al., 2015).

Embora a enfermidade apresente distribuição mundial, sua ocorrência é maior em áreas pantanosas em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, sendo endêmica na Tailândia e em algumas regiões do Brasil, como o Pantanal e Rio Grande do Sul (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; GAASTRA et al., 2010, LEAL et al., 2001, MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). Não há predisposição por sexo, idade ou raça, sendo o fator determinante para a infecção a presença de zoósporos no ambiente, não havendo relatos de transmissão direta entre animais e entre animais e o homem (MENDONZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO et al., 2006).

As condições ambientais são cruciais para o desenvolvimento e a reprodução de *P. insidiosum* e, conseqüentemente, a ocorrência da enfermidade. Esse fato se deve ao ciclo biológico do oomiceto, que requer ambiente aquático com baixas concentrações de íons, pH próximo da neutralidade e uma planta como hospedeiro para manter seu ciclo na natureza (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Seu ciclo tem como princípio a colonização de plantas aquáticas, que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução assexuada do micro-organismo, formando zoosporângios. Zoósporos móveis são liberados a partir dessas estruturas e ficam livres na água movimentando-se até encontrar outra planta, onde se encistam e emitem tubos germinativos, formando um novo micélio e completando

seu ciclo (MILLER, 1983). Os animais provavelmente se infectam ao entrar em contato com esses ambientes alagados. Segundo Mendoza, Ajello; McGinnis (1996), os zoósporos são atraídos por quimiotaxia para pele danificada, se fixam em uma lesão da pele e se encistam emitindo tubos germinativos. Comumente, observa-se que os indivíduos afetados permanecem por longos períodos em contato com água parada em lagos, lagoas ou lugares pantanosos (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995). Todavia, o desenvolvimento da enfermidade irá depender da imunidade do animal (MENDONZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Por outro lado, Mendoza e Vilella (2013) citam que a pitiose em mamíferos é normalmente observada em hospedeiros saudáveis e, baseados no fato que poucos casos de pitiose são observados em equinos e humanos em regiões endêmicas, acreditam que a resposta imunológica inicial a *P. insidiosum* é capaz de eliminar o patógeno.

Dentre as várias espécies que podem ser infectadas por *P. insidiosum*, os equinos, caninos e o homem representam os principais hospedeiros afetados. Sem dúvidas, os equinos são os animais mais afetados. Nesta espécie a enfermidade caracteriza-se pelo desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, que evoluem rapidamente, formando grandes massas teciduais de bordas irregulares e aparência tumoral, localizadas predominantemente nas extremidades. No interior das lesões, formada por abundante tecido conjuntivo fibroso, encontram-se massas branco-amareladas, de aspecto arenoso e ramificadas, denominadas *kunkers*, que facilmente se desprendem do tecido circunjacente (CHAFFIN; SCHUMACHER; MCMULLAN, 1995; MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Os *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, em ambiente favorável e água estagnada, refazem o ciclo do oomiceto colonizando novas plantas e mantendo a re-contaminação do ambiente (FONSECA et al., 2014b).

Os caninos, quando infectados por *P. insidiosum* desenvolvem piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (MILLER et al., 1983; FOIL et al., 1984; GROOTERS, 2003). As lesões gastrintestinais são as mais comuns e caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino que levam a obstrução da luz do órgão (GROOTERS, 2003).

Nas demais espécies, incluindo bovinos (PÉREZ et. al., 2005; GRECCO et al., 2009), ovinos (TABOSA et al., 2004), caprinos (DO CARMO et al., 2015), felinos

(BISSONNETTE et al., 1991; RAKICH et al., 2005) e outros mamíferos selvagens (CAMUS;GROOTERS; AQUILAR, 2004; VIDELA et al 2012), a enfermidade é esporádica (GROOTERS, 2003) e normalmente manifesta-se nas formas cutâneas/subcutâneas com desenvolvimento de lesões ulcerativas.

Em humanos a enfermidade apresenta prognóstico ruim e pode ocorrer de três formas: cutânea, ocular e sistêmica (TRISCOTT et al., 1993; IMWIDTHAYA, 1994, 1995; SHENEP et al., 1998; SUDJARITRUCK; SIRISANTHANA, 2011; KEOPRASOM et al., 2012). Essa doença é comum e preocupante no Sudeste da Ásia, destacando-se a Tailândia como uma região endêmica, com taxas de morbidade e mortalidade elevadas (KRAJAEJUM et al., 2006). Nesses locais algumas formas da doença estão associadas com a síndrome de α e β -talassemia, comuns na região. KRAJAEJUM et al. (2006) ao realizarem um levantamento epidemiológico da pitiose na Tailândia, verificaram que num período de 18 anos, ocorreram 102 casos da enfermidade. No Brasil, apenas um caso de pitiose no homem foi relatado por Bosco et al. (2005).

A reprodução experimental da pitiose em coelhos pode ser obtida por meio da inoculação subcutânea de zoósporos de *P. insidiosum*. Esta espécie é o modelo experimental da enfermidade, uma vez que as várias tentativas de reprodução experimental da doença em espécies naturalmente infectadas resultaram em insucesso (MENDOZA; NEWTON, 2005). Após inoculação, os animais evidenciam nódulos que evoluem para fibrogranulomas eosinofílicos após 20-30 dias de inoculação (MILLER; CAMPBELL, 1983). Nos últimos anos, vários estudos têm utilizado coelhos como modelo experimental para avaliar imunoterapias (SANTURIO et al., 2003, PEREIRA et al., 2008; FONSECA et al., 2015b) e terapias antifúngicas (PEREIRA et al., 2007; LORETO et al., 2011, ARGENTA et al., 2012; ZANETTE et al., 2015) como alternativas de tratamento da pitiose.

Ressalta-se que em todas as espécies afetadas, com exceção dos bovinos, a pitiose é grave, os tratamentos empregados nem sempre são eficazes e muitos animais morrem ou são sacrificados. Interessantemente, nos bovinos a pitiose é auto-limitante e a enfermidade ocorre na forma de surtos, afetando um número considerável de animais, o que não se observa nas outras espécies suscetíveis (SANTURIO et al., 1998, PÉREZ et al., 2005, GRECCO et al., 2009).

3.2 Métodos terapêuticos

A pitiose merece destaque pela dificuldade de tratamento e devido a letalidade das espécies afetadas. Inúmeros tratamentos são utilizados, incluindo quimioterapia (antifúngicos, macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, compostos orgânicos entre outros), cirúrgico e imunoterapia (CHAFFIN; SCHUMACHER; HOOPER, 1992; FOIL, 1996; SANTURIO et al., 2006). O sucesso das terapias depende do tamanho, tempo, localização da lesão, idade e estado nutricional do animal (MENDOZA et al., 1997), sendo muito frequentemente, relatado insucesso ou recidiva (BISSONNETTE et al., 1991; SEKHON, PADHYE; GARG, 1992; PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2010; DÓRIA et al., 2012).

A cirurgia é o método comumente empregado e utilizado no tratamento da pitiose em animais e no homem, todavia, altas taxas de recidiva (45%) são observadas (GAASTRA et al., 2010). Além disso, este procedimento é dificultado pelas estruturas anatômicas envolvidas, principalmente os membros (MILLER, 1981).

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). O primeiro protocolo para essa terapia foi proposto por Miller (1981), ao utilizar um imunoterápico com hifas inativadas de *P. insidiosum* no tratamento de um equino com pitiose. Posteriormente, várias pesquisas empregaram outras formulações de imunoterapia na pitiose equina, obtendo índices de cura que variaram de 50 a 83% (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al. 1992; MONTEIRO, 1999, SANTURIO et al., 2003). Embora a imunoterapia seja considerada uma prática segura, com índices de cura de aproximadamente 60-70% em equinos e humanos, há muitos casos não responsivos e em algumas espécies como cães e gatos os resultados são desapontadores (MENDOZA; NEWTON, 2005).

A terapia antifúngica tem sido frequentemente empregada no tratamento da pitiose em animais e no homem. No entanto, na maioria das vezes, os fármacos empregados no tratamento da pitiose são ineficazes e os animais atingidos não sobrevivem em decorrência da infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003).

Mc Mullan et al. (1977) utilizaram a terapia com anfotericina B em equinos, obtendo 50% de eficácia quando combinada à remoção cirúrgica; ao passo que apenas 30%

dos animais responderam à terapia quando aplicada somente anfotericina B e 20% não apresentaram nenhuma melhora no quadro clínico. Posteriormente, Dória et al. (2012) obtiveram regressão da lesão em 92% dos equinos tratados com anfotericina B aliada à excisão cirúrgica da lesão. Na pitiose canina relata-se a terapia com cetoconazol, itraconazol, anfotericina e fluconazol com resultados desanimadores (ENGLISH e FROST, 1984; FOIL et al., 1984; DYKSTRA et al., 1999, JAEGER; ROTSTEIN; LAW, 2002; RIVIERRE et al., 2005). Grooters (2003) observou respostas positivas ao tratamento com itraconazol ou anfotericina B lipídica em 15% dos cães com pitiose gastrointestinal. Esse mesmo autor concluiu, ao obter cura clínica e sorológica em diversos casos de pitiose cutânea, tanto em caninos como em felinos tratados com a combinação entre terbinafina e itraconazol, que embora os índices responsivos a esse tipo de tratamento sejam baixos, a associação entre antifúngicos é mais eficaz do que a terapia isolada. Pereira et al. (2013) relataram a cura de um canino com pitiose gastrointestinal com associação entre terbinafina, itraconazol e imunoterapia.

No tratamento da pitiose felina os resultados são pouco promissores. Bissonnette et al. (1991) obtiveram melhora do quadro clínico ao tratar um felino com cetoconazol, todavia o animal apresentou recidiva da lesão após finalizar o tratamento. Ao passo que Rakich Grooters e Tang (2005) observaram cura clínica, sem recidivas, ao tratar um felino com pitiose gastrointestinal utilizando a combinação entre terbinafina e itraconazol após cirurgia.

Na incessante busca por tratamentos da doença, diversos estudos avaliando a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos fármacos antifúngicos têm sido realizados. Em 1992, Shekhon, Padhye e Garg, obtiveram inibição de *P. insidiosum* ao utilizar fluconazol, cetoconazol e miconazol, ao passo que ao testarem anfotericina B, os resultados foram insatisfatórios. Contrariando aos testes *in vitro*, previamente Triscott et al. (1993), observaram resultados positivos no tratamento de humanos com pitiose periorbital com anfotericina B. Adicionalmente, Shenep et al. (1998) observaram o sinergismo *in vitro* ao combinar itraconazol e terbinafina e *in vivo* no tratamento de uma criança com infecção facial. Posteriormente, Pereira et al. (2007), Pereira, 2008 e Argenta et al. (2010) demonstraram a fraca suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* à caspofungina. Similarmente, Zanette et al. (2015) avaliaram a atividade da micafungina isolada e na combinação com deferasirox sobre *P.*

insidiosum em animais experimentais. Os autores relataram que a micafungina quando utilizada como única terapia, apresentou baixa efetividade, ao passo que quando combinada com deferasirox evidenciou sinergismo. Na permanente busca de novas terapias para pitiose, pesquisas empregando outros fármacos com ação antimicrobiana, incluindo macrolídeos, aminoglicosídeos, tetraciclina, compostos orgânicos entre outros foram testados *in vitro*. Os resultados dessas pesquisas demonstraram variável suscetibilidade deste oomiceto a essas classes de fármacos (LORETO et al., 2011; 2012; MAHL et al., 2012; LORETO et al., 2014; JESUS et al., 2015a).

3.2.1 Antifúngicos

As falhas terapêuticas com fármacos antifúngicos são explicadas em parte pelas características de *P. insidiosum* que diferem dos fungos verdadeiros, sobretudo na sua composição de membrana celular (LEAL et al., 2001). Dessa forma, as drogas antifúngicas são ineficientes e a maioria dos animais atingidos não sobrevive em decorrência da infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Contudo, esses fatores estimularam várias tentativas de tratamento e testes de susceptibilidade *in vitro*, as quais foram realizadas utilizando fármacos antifúngicos como anfotericina B, azólicos, compostos iodínicos, terbinafina, caspofungina, tigeciclina, equinocandinas, além de outros antimicrobianos como macrolídeos, tetraciclina, aminoglicosídeos, entre outros, com resultados variáveis e muitas vezes incoerentes com os testes *in vivo* (MCMULLAN et al., 1977; ENGLISH; FROST, 1984; FOIL et al., 1984; BISSONETTE et al., 1991; CHAFFIN; SCHUMACHER; HOOPER, 1992; SEKHON; PADHYE; GARG, 1992; MEIRELLES et al., 1993; TRISCOTT et al., 1993; SHENEP et al., 1998; DYKSTRA et al., 1999; JAEGER; ROTSTEIN; LAW, 2002; GROOTERS, 2003; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005; RIVIERRE et al., 2005; ARGENTA et al., 2010; LORETO et al., 2011, 2012; MAHL et al., 2012; DÓRIA et al., 2012; PEREIRA et al., 2007; 2013; LORETO et al., 2014; ZANETTE et al., 2015).

3.2.1.1 Itraconazol

O itraconazol (figura 1) tem sua atividade antifúngica atribuída às características do grupo ao qual pertence: o grupo dos derivados triazólicos, os quais atuam comprometendo a biosíntese do ergosterol, componente da membrana citoplasmática dos fungos, através da inibição da enzima 14 α -esterol desmetilase dependente do citocromo P-450, responsável pela converção do lanosterol em ergosterol (figura 3) (GHANNOUM; RICE, 1999). Esse mecanismo de ação resulta no acúmulo de esteróis que comprometem as funções de conjuntos enzimáticos ligados à membrana como enzimas transportadoras de elétrons e ATPase (GEORGOPAPADAKOU; WALSH, 1996).

O ergosterol é o principal componente da membrana citoplasmática na célula fúngica. Alterações na configuração ou biosíntese desse esteróide comprometem a integridade da célula, uma vez que o mesmo é responsável pelo controle osmótico, detacando-se sua participação na respiração celular através da citocromo c oxidase mitocondrial (BOSSCHE et al., 2003). Além disso, a diminuição de sua produção acarreta o aumento na produção de quitina na parede celular alterando toda a configuração natural da célula, prejudicando suas vias metabólicas (BOSSCHE et al., 1985).

A atuação farmacológica do itraconazol se dá pela administração via oral, sendo posteriormente, metabolizado pelo fígado e seus metabólitos eliminados na urina. Esse medicamento possui como características a lipossolubilidade elevada e seus níveis terapêuticos seguem ativos e com maior disponibilidade nos tecidos do que no plasma, tendo como tempo de meia vida até 36 horas (BENNET 2003; BOSSCHE et al., 2003).

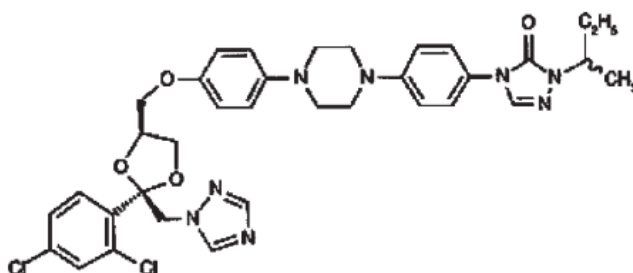


Figura 1: Estrutura química do itraconazol.

Fonte: CAZEDEY et al., 2007.

3.2.1.2 Terbinafina

A terbinafina é um fármaco antifúngico pertencente ao grupo das alilaminas (Figura 2). Possui caráter ceratinofílico e altamente lipofílico (COSTA E GÓRNIK, 2002). Esse fármaco atua em uma etapa precursora à biossíntese do ergosterol (figura 3), agindo na enzima esqualeno-epoxidase, o que ocasiona a deficiência de ergosterol na membrana e acúmulo intracelular de esqualeno o qual é torna tóxico para a célula, levando-a à morte (Figura 2). Esse fármaco é administrado por via oral ou tópica, com metabolização hepática pelo citocromo P-450 e seus metabólitos são excretados na urina (BENNET, 2003). É empregado na terapia das dermatofitoses e onicomicoses, além de atuar contra fungos filamentos, dimórficos, dematiáceos e algumas espécies de leveduras (BALFOUR; FAULDS, 1992; VAZQUEZ, 2003).

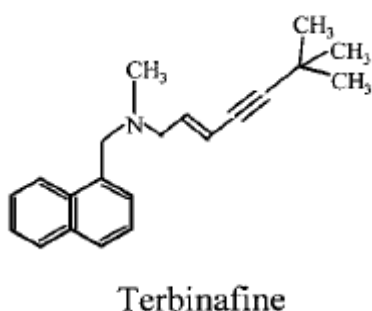


Figura 2: Estrutura química da terbinafina.

Fonte: GHANNOUM; RICE, 1999.

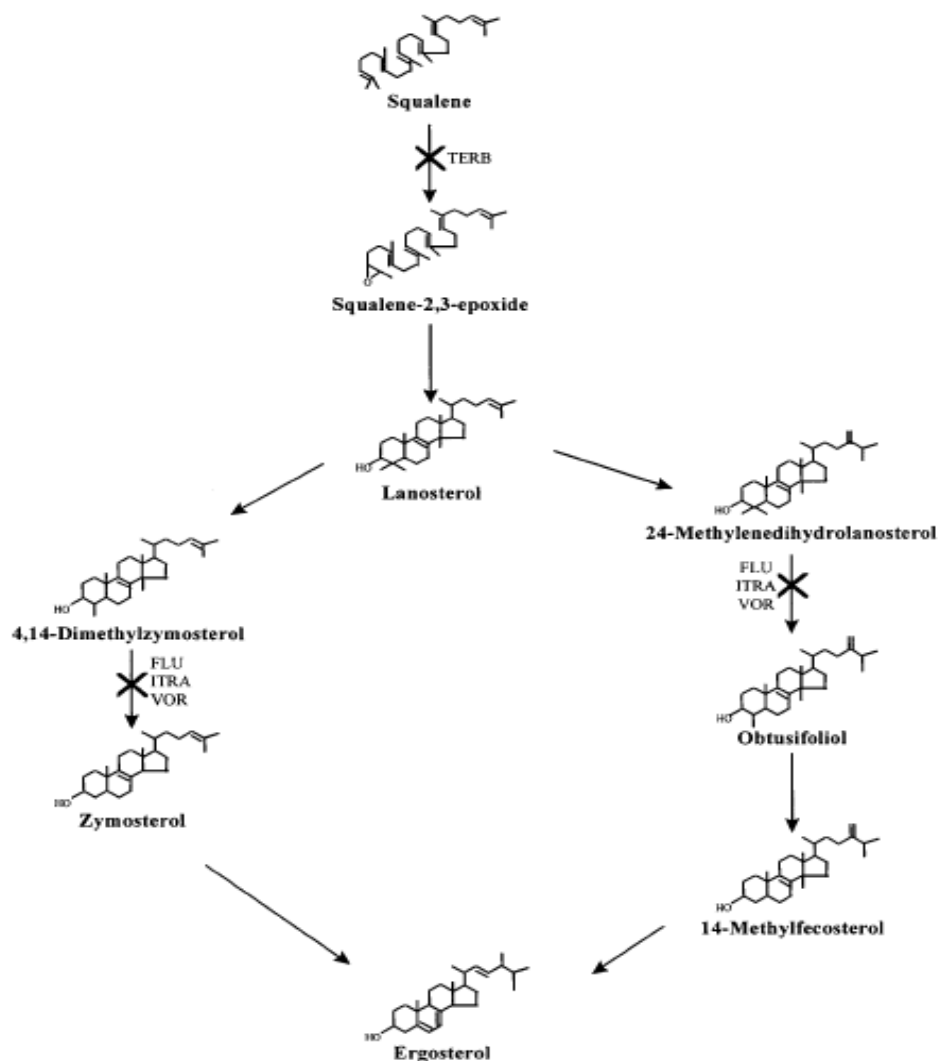


Figura 3: Rota de biossíntese do ergosterol onde atuam o itraconazol e a terbinafina.

Fonte GHANNOUM; RICE, 1999.

3.2.2 Óleos essenciais

A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga, baseada nos conhecimentos populares. Pesquisas empregando óleos essenciais e extratos de plantas vêm se destacando na área de terapia antimicrobiana devidos às suas propriedades que vão desde antioxidantes, antimicrobianas até antineoplásicas (NASCIMENTO et al., 2000; BAKKALI et al., 2008). Além disso, sua utilização se fez necessária a partir do momento em que o número de cepas de micro-organismos resistentes aos fármacos químicos convencionais disponíveis no

mercado aumentou drasticamente (DORMAN; DEANS et al., 2000). Os óleos essenciais são compostos aromáticos originários do metabolismo secundário das plantas. Esses são obtidos por arraste de vapor d'água ou hidrodestilação. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é atribuída à presença de aldeídos, fenóis e alcoóis (BRUNI et al., 2004). O mecanismo de ação não difere entre as espécies de plantas das quais os óleos são extraídos; e envolve a lise da membrana citoplasmática com perda da integridade e saída de íons (hidrogênio, potássio e cálcio) e inibição da respiração (DORMAN; DEANS, 2000; RAO et al., 2010).

Estudos avaliando a ação de óleos essenciais sobre *P. insidiosum* ainda são incipientes, entretanto os resultados são bastante animadores (FONSECA, 2011, FONSECA et al., 2014a). Outros estudos que avaliaram a atividade de compostos naturais extraídos ou compostos biotivos oriundos de plantas também relataram atividade frente a este oomiceto (SRIPHANA et al., 2013^a; SRIPHANA et al., 2013b; SUTHIWONG et al., 2014, JESUS et al., 2015b).

3.2.2.1 Plantas da família Lamiaceae (*Mentha piperita* e *Origanum vulgare*)

Pertencentes à família Lamiaceae, ordem Tubiflorae Lamiales, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* são conhecidas pelas suas propriedades antimicrobianas (LIMA; CARDOSO, 2007).

As mentas são plantas nativas do Oriente Médio que foram introduzidas nas Américas, sendo cultivadas em regiões temperadas e subtropicais de clima ameno. Através dos imigrantes japoneses, que cultivavam em pequenas quantidades para uso, chegaram ao Brasil, no interior de São Paulo no início do século XX (MAIA, 1998). Algumas espécies recebem o nome popular de hortelã e são consumidas *in natura* como hortaliças. O gênero *Mentha* consiste em plantas e ervas aromáticas perenes cultivadas para extração de seus óleos essenciais tanto para fins medicinais como culinários (GOBERT et al., 2012).

O óleo essencial de *M. piperita* possui como componentes majoritários mentol e mentona, compostos monoterpenos responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (ISCAN et al., 2002; TYAGI; MALIK, 2011; FONSECA et al., 2015a). Diversos

trabalhos têm sido realizados demonstrando sua atividade antimicrobiana contra bactérias (TYAGI; MALIK, 2011; KAČÁNIOVÁ et al., 2014), fungos filamentosos (PEREIRA, et al., 2006) e leveduras (TYAGI; MALIK, 2011). Pesquisas realizadas utilizando esse óleo contra espécies de *Pythium* fitopatógenas têm obtido bons resultados. Zambonelli et al. (1996) e Lee et al. (2007) comprovaram a atividade antimicrobiana de *M. piperita* frente a *Pythium ultimum*. Adicionalmente, Wogiatzi et al. (2009) evidenciaram resultados positivos no efeito desse antimicrobiano sobre *Pythium* spp.

Origanum vulgare, conhecida popularmente como orégano, é um dos temperos mais conhecidos no mundo, sendo utilizado diariamente na culinária (FLEISHER e FLEISHER, 1988). Essa planta é cultivada em toda a Europa, leste e centro da Ásia e Taiwan, sendo a grande maioria originária do Mediterrâneo (Turquia, Irã e Grécia) (KOKKINI; KAROUSOU ; VOKOU, 1994; KAUL; SINGH; SOOD, 1996). Também foi introduzida na América do Norte para fins de utilização culinária (VOKOU; KOKKINI; BESSIERE, 1993). As diversas espécies de *Origanum*. são conhecidas por suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (LEUNG; FOSTER, 1996; MILOS MASTELIC; JERCOVIK, 2000).

O óleo essencial de *O. vulgare* possui como componentes majoritários o carvacrol, thymol, 4-terpineol e linalool (SOYLU; SOYLU; KURT, 2006; HUSSAIN et al., 2011; FONSECA et al., 2015a). Diversos estudos têm comprovado suas propriedades antimicrobianas sobre bactérias (SANTURIO et al., 2007; KAČÁNIOVÁ et al., 2014), fungos filamentosos (PEREIRA, et al., 2006; ARSLAN; DERVIS, 2010; CLEFF et al., 2010ab; MUGNAINI et al., 2012, 2013) e fungos leveduriformes (CLEFF et al., 2010a). Esse óleo também foi testado sobre espécies do gênero *Pythium* patógenas de plantas. Lee et al. (2007) comprovou sua eficácia sobre *P. ultimum*, apresentando 93% de inibição desse micro-organismo. Adicionalmente, Wogiatzi et al., (2009) obteve bons resultados de inibição do crescimento de *Pythium* spp.

Recentemente, Fonseca (2011) e FONSECA et al. (2015a) demonstraram *in vitro* a ação anti-*Pythium* do óleo essencial de *M. piperita* e *Origanum vulgare* sobre *P. insidiosum*.

3.2.2.1 *Melaleuca alternifolia*

M. alternifolia (“tea tree” ou árvore do chá) é uma planta da família Myrtaceae, ordem Myrtales (RUSSEL; SOUTHWELL, 2002) e tem sido utilizada por possuir propriedades terapêuticas há muitos anos nas populações da Austrália (CARSON; RILEY, 1998; HALCON; MILKUS, 2004).

O óleo essencial dessa planta tem sido alvo de diversas pesquisas por apresentar funções medicinais comprovadas atuando como antibacteriano, antifúngico, antiprotzoário e anti-inflamatório (BAKKALI et al., 2008). Sua eficácia é justificada pela sua composição química, pois as plantas dessa espécie apresentam em torno de 100 componentes, destacando-se o terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α terpineol, terpinoleno e α - e γ -terpineno os quais representam cerca de 90% da estrutura do óleo (BROPHY et al., 1989).

Dentro do seu perfil antibacteriano destacam-se os estudos realizados por Cox et al. (2000); Carson, Mee e Riley (2002); Simões et al. (2002); Bertini et al. (2005); Packer e Luz (2007); Pereira, et al. (2008); Oliveira et al.(2011); Ramos et al. (2012); Santos et al. (2014); Souza et al. (2014); Sagave et al. (2015). Como característica antifúngica estudos realizados por Hammer, Carson e Riley (2002); Campacci et al. (2005); Martins et al. (2010); Lorenzetti et al. (2011); Nascimento et al. (2014); Souza et al. (2014); Flores et al. (2013); comprovaram sua ação antimicrobiana. Não há relatos na literatura de sua aplicabilidade no combate a *P. insidiosum*. Entretanto existem alguns desafios enfrentados na sua utilização, uma vez que suas propriedades químicas tais como solubilidade e volatilidade lhe conferem certo grau de instabilidade em seu produto final (CARSON; RILEY; COOKSON, 1998).

3.3 Nanoemulsões

Os sistemas de veiculação de fármacos antifúngicos em nanoestruturas são apresentados como um tratamento alternativo de infecções fúngicas resistentes às terapias disponíveis no mercado, pois podem modificar a interação entre a célula fúngica e o fármaco (WHITE et al., 1998). O termo nanopartícula polimérica pode ser

aplicado tanto às nanocápsulas quanto às nanoesferas, as quais podem ser formadas por polímeros biodegradáveis. Dessa forma, essas duas tecnologias são definidas como sistemas veiculadores de fármacos as quais, por via de regra, apresentam diâmetro inferior a 1µm (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003; REIS et al., 2006; GUTERRES; ALVES; POHLMANN, 2007; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Estudos realizados por Oliveira et al. (2011); Marini et al. (2014); Santos et al. (2014); Souza et al. (2014) e Manaia (2015) comprovam que as nanoemulsões preservam a estabilidade e eficácia dos extratos de *M. alternifolia*. Além disso, Flores et al. (2013) e Chifiriuc et al. (2012) comprovaram que as nanoemulsões desse óleo essencial podem ser uma alternativa no combate a fungos patogênicos.

3.4 Associações de antimicrobianos

Diante do grande arsenal de antimicrobianos disponíveis no mercado e da resistência de muitos micro-organismos aos fármacos convencionais, uma linha terapêutica de destaque é a que emprega a combinação/associação entre esses agentes. Segundo Zhu, Gil-Lamaignere e Müller (2004) a associação de dois compostos pode aumentar a taxa de morte microbiana e encurtar a duração do tratamento, bem como permitir o uso de doses mais baixas de cada composto, reduzindo os efeitos tóxicos dos mesmos. Além disso, segundo esses autores, a combinação de dois fármacos que possuem mecanismos de ação diferentes pode evitar o desenvolvimento de resistência por parte dos micro-organismos e ampliar o espectro de atuação sobre os mesmos.

A técnica de *checkerboard* é conhecida como um método padrão para avaliar *in vitro* combinações entre antimicrobianos. Esse modelo utiliza tubos ou placas de microdiluição, associando dois agentes antimicrobianos em diversas concentrações acima e abaixo da Concentração Inibitória Mínima (CIM) sobre o micro-organismo a ser avaliado. O Índice de Concentração Inibitória Fracionária (FICI) atua em conjunto com essa técnica, tratando-se da combinação mais baixa entre fármacos capaz de inibir o crescimento do micro-organismo testado (CUENCAS-ESTRELLA, 2004).

Esse índice classifica quantitativamente a interação em sinérgica ($FICI \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < FICI \leq 4$) ou antagônica ($FICI > 4$) (JOHNSON et al., 2004).

Segundo Johnson et al. (2004) o sinergismo é uma interação positiva entre dois compostos que pode ser causada pelos seguintes fatores: inibição de diferentes estágios da mesma via bioquímica; melhor penetração de um antimicrobiano resultante da ação de outro antimicrobiano na parede celular ou membrana citoplasmática; pela interação de transporte; pela inibição simultânea de diferentes alvos na célula fúngica; ou pela atividade fungicida rápida. No entanto, a ausência de sinergismo não significa uma desvantagem, pois pode haver outros possíveis benefícios de combinações terapêuticas como a diminuição no valor das CIM.

Estudos que servem de parâmetro e correlação com a clínica utilizam os padrões do *Clinical Laboratory Standards* (CLSI) como método referencial. O protocolo M38-A é uma normativa-padrão em consenso com o CLSI a ser empregada em testes que utilizem diluição em caldo com o objetivo de determinar a suscetibilidade *in vitro* de fungos filamentosos às terapias antifúngicas (CLSI, 2008).

Uma vez que as combinações entre agentes antimicrobianos têm demonstrado os melhores resultados no tratamento da pitiose, estudos avaliando a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* a essas terapias combinadas foram incrementados nos últimos anos. Nesse contexto, observa-se que os resultados das pesquisas que combinaram agentes antifúngicos entre si ou com fármacos com outros mecanismos de ação sempre demonstraram algum grau de sinergismo nas combinações. Argenta et al. (2008) ao testarem itraconazol ou voriconazol combinados com terbinafina, obtiveram sinergismo em 16,6% dos isolados de *P. insidiosum* avaliados. Similarmente, Cavalheiro et al. (2009a) relataram sinergismo quando a terbinafina foi combinada com a caspofungina (41,2%), o cetoconazol (29,4%) ou o miconazol (11,8%). Posteriormente, Cavalheiro et al. (2009b) mostraram que terbinafina apresentou interação sinérgica combinada com anfoterina B. Adicionalmente, Argenta et al. (2012) realizaram um estudo *in vitro* e *in vivo* avaliando duplas e triplas combinações de terbinafina, itraconazol, caspofungina, ibuprofeno e fluvastatina frente ao oomiceto *P. insidiosum*. Os resultados desse trabalho evidenciaram que as combinações de terbinafina com caspofungina ou ibuprofeno foram sinérgicas para 47% dos isolados testados, não sendo observado antagonismo em nenhuma das duplas combinações. Embora as triplas combinações tenham evidenciado os maiores índices de indiferença; sinergismo e antagonismo também foram verificados

nestas combinações. Neste mesmo estudo, o experimento *in vivo*, revelou que as lesões cutâneas dos animais experimentais que foram tratados com terbinafina, itraconazol e fluvastatina diferiram significativamente dos demais.

Zanette et al. (2015) relataram a ineficácia da micafungina, uma equinocandina, sobre *P. insidiosum*. Todavia, interações sinérgicas relevantes foram observadas quando combinaram este fármaco com deferasirox. Porém, este efeito não teve correlação com seus ensaios *in vivo*.

Posteriormente, a atividade *in vitro* anti-*P. insidiosum* das combinações de azitromicina, claritromicina, minociclina ou tigeciclina com antifúngicos (anfotericina B, itraconazol, terbinafina, voriconazol, anidulafungina, caspofungina e micafungina) foram avaliadas por Jesus et al. (2015a). Os autores observaram que os principais sinergismos ocorreram com as combinações de minociclina com anfotericina B (73.33%), itraconazol (70%) e micafungina (70%) e da claritromicina com a micafungina (73.33%), demonstrando que essas combinações podem vir a se constituir numa alternativa terapêutica na pitiose em animais e no homem. Adicionalmente, Jesus et al. (2015a) demonstraram que o emprego da azitromicina (20 mg/kg/dia, 2X) isoladamente ou em combinação com a minociclina (10 mg/kg/dia, 2X) reduziram significativamente a carga fúngica das lesões cutâneas de pitiose em coelhos, evidenciando o potencial efeito curativo da azitromicina na pitiose experimental.

Recentemente, pesquisas têm demonstrado que a combinação de óleos essenciais ou de compostos bioativos de plantas com diferentes fármacos antimicrobianos, incluindo antifúngicos podem se constituir numa vantagem terapêutica no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. Nesse sentido, o sinergismo acima de 60% observado por Jesus et al. (2015b) nas combinações de carvacrol ou timol com itraconazol, terbinafina, claritromicina, minociclina e azitromicina, bem como o sinergismo *in vivo* observado por Fonseca et al. (2015b) ao tratar coelhos com pitiose experimental com uma combinação de óleo essencial de *O. vulgare* e *M. piperita*, apontam que esses tipos de combinações podem se constituir numa terapia adicional da pitiose.

4 Manuscrito 1

Manuscrito submetido à Revista Iberoamericana de Micologia

<http://www.elsevier.es/es-revista-revista-iberoamericana-micologia-290-normas-publicacion>

In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in its free oil and nanoemulsion formulations against *Pythium insidiosum

Júlia de Souza Silveira Valente, Anelise de Oliveira da Silva Fonseca, Cristina Gomes Zambrano, Lauren Sagave, Fernanda Flores Cramer, Cristiane de Bona da Silva, Luís Antônio Sangioni, Luciana Pötter, Janio Morais Santurio, Sônia de Avila Botton, Daniela Isabel Brayer Pereira

In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in its free oil and nanoemulsion formulations against *Pythium insidiosum

Actividad *in vitro* de *Melaleuca alternifolia* (Te de árbol) en sus formulaciones de aceite libre y nanoemulsión frente a *Pythium insidiosum*

Running title: *In vitro* activity of Tea Tree against *Pythium insidiosum*

Título breve: Actividad *in vitro* de Te de árbol frente a *Pythium insidiosum*

Júlia de Souza Silveira Valente¹, Anelise de Oliveira da Silva Fonseca¹, Cristina Gomes Zambrano¹, Lauren Sagave², Fernanda Flores Cramer², Cristiane de Bona da Silva², Luís Antônio Sangioni², Luciana Pötter², Janio Moraes Santurio², Sônia de Avila Botton², Daniela Isabel Brayer Pereira^{1*}

¹Universidade Federal de Pelotas (UFPeL), Pelotas, RS, Brazil.

²Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria/RS, Brazil.

*Corresponding author. Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Laboratório de Micologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário Capão do Leão, s/nº. CEP: 96160-000. Tel.: +55 53 32757338; Fax: +55 53 32757338. E-mail address: danielabraye@gmail.com.

Abstract

Background: *Pythium insidiosum* is an important aquatic oomycete, which can cause pythiosis both in animals and humans. This microorganism shows low susceptibility to antifungal drugs available.

Aims: This study analyzed the *in vitro* antimicrobial activity of *Melaleuca alternifolia* in its free oil (FO) and nanoemulsion (NE) formulations against Brazilian *P. insidiosum* isolates.

Method: The antimicrobial activity evaluation was performed by the broth microdilution method according to CSLI M38-A2 document adapted to phytopharmaceuticals. Twenty-six *P. insidiosum* isolates were evaluated, and the minimum inhibitory concentration was determined at 100% growth inhibition. *M. alternifolia* essential oil or FO was obtained commercially. The NE containing 1% *M. alternifolia* essential oil was prepared by the spontaneous emulsification method.

Results: All *P. insidiosum* isolates evaluated showed minimum inhibitory concentrations (MIC) ranging from 0.53 to 2.13 mg/mL for the FO formulation; MIC₅₀ and MIC₉₀ showed values between 1.06 and 2.13 mg/mL, respectively. When the NE formulation was evaluated, MIC values ranged from 0.13 to 2.13 mg/mL and both MIC₅₀ and MIC₉₀ corresponded to 1.06 mg/mL.

Conclusions: FO and NE formulations of *M. alternifolia* showed antimicrobial activity against *P. insidiosum*. This study demonstrated that *M. alternifolia* oil can be an additional therapy in pythiosis treatment; however, further studies are needed to evaluate the applicability of the plant essential oils in the treatment of clinical pythiosis.

Key Words: oomycete, pythiosis, medicinal plants, nanostructured systems.

Resumen

Antecedentes: *Pythium insidiosum* es un importante oomycete acuático, que puede causar pitiosis tanto en animales como en humanos. Este microorganismo presenta una baja sensibilidad frente a las drogas antifúngicas disponibles.

Objetivos: Este estudio analizó la actividad antimicrobiana *in vitro* de *M. alternifolia* en sus formulaciones de aceite libre (AL) y nanoemulsión (NE) contra aislados brasileños de *P. insidiosum*.

Métodos: La evaluación de la actividad antimicrobiana fue realizada por el método de microdilución en placa de acuerdo con lo descrito en el documento CSLI M38-A2 adaptado a fito farmacéuticos. Veinte seis aislados de *P. insidiosum* fueron evaluados y se determinó la concentración mínima inhibitoria para inhibir el crecimiento al 100%. El AL de *M. alternifolia* fue obtenido de manera comercial. La nanoemulsión conteniendo 1% del aceite esencial de *M. alternifolia* fue preparada por el método de la emulsificación espontánea.

Resultados: Todos los aislados evaluados de *P. insidiosum* mostraron concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) en un rango entre 0,53 a 2,13 mg/mL para el AL formulación; MIC₅₀ y MIC₉₀ mostraron valores de 1,06 y 2,13 mg/mL respectivamente. Cuando la formulación NE fue evaluada, se observaron CMI en un rango entre 0,13 a 2,13 mg/mL y ambos MIC₅₀ y MIC₉₀ correspondieron a 1,06mg/mL.

Conclusiones: Las formulaciones del AL y NE de *M. alternifolia* mostraron actividad antimicrobiana contra *P. insidiosum*. Este estudio demostró que el aceite esencial de *M. alternifolia* puede ser una terapia adicional en el tratamiento de la pitiosis; sin embargo, se necesitan estudios adicionales para evaluar la aplicabilidad de los aceites esenciales de la planta en el tratamiento de la pitiosis clínica.

Palabras claves: oomycete, pitiosis, plantas medicinales, sistemas nanoestructurados

Introduction

Pythium insidiosum is an important aquatic oomycete, which is the etiologic agent of pythiosis in animals and humans. This disease is devastating and can have cutaneous, gastrointestinal, ophthalmic and systemic manifestations. It is difficult to treat and has unfavorable prognosis.^{14,18} Therapeutic options include surgery, immunotherapy and antimicrobial agents; however, the success of these practices is variable. Surgery is often employed in the treatment of human and animal pythiosis, though there have been reports of high recurrence rates (45%). Immunotherapy is another alternative, which has been widely used in the treatment of equine pythiosis. Although this is considered a safe method with healing rates ranging from 60 to 70 %, there were several nonresponsive cases involving horses.¹⁸

Ergosterol is the target site of most antifungal agents, which are usually used in the treatment of fungal infections. However, the absence of ergosterol in the cytoplasmic membrane of *P. insidiosum* limits the arsenal of available drugs for the treatment of pythiosis.^{14,19} In this sense, recent *in vitro* and *in vivo* studies using medicinal plants have evaluated the susceptibility of *P. insidiosum* aiming to find future therapeutic applications in clinical pythiosis.^{15-17,22,34,35}

Melaleuca alternifolia (tea tree) essential oil has been evaluated in several studies due to its antibacterial activity on *Rhodococcus equi*²⁹ and *Staphylococcus aureus*⁸, antifungal activity on *Trichophyton rubrum*¹³, antiprotozoal action against *Trypanosoma evansi*⁴, antiviral action against herpesvirus type 1²⁶, as well as anti-inflammatory action such as in human hypersensitivity cases.²⁸

Nanotechnology is a technological innovation that aims to improve the physical and chemical characteristics of bioactive substances. Nanostructured systems, including nanocapsules, nanospheres and nanoemulsions, have been the purpose of studies on new ways

of carrying drugs to specific sites and the controlled release of active substances.³¹ Nanoemulsions are dispersions of oil in water stabilized by surfactants that can promote drug toxicity decrease and therapeutic effect increase.^{1,31} Previous studies have shown that nanoemulsions preserve the stability and effectiveness of *M. alternifolia* extracts.^{12,24,25,27,29,30,32} In addition, research have shown that *M. alternifolia* essential oil in nanostructures can be an alternative to fungal infection treatment.^{9,13}

This study analyzed the *in vitro* antimicrobial activity of *M. alternifolia* in its free oil and nanoemulsion formulations against Brazilian isolates of *P. insidiosum*.

Material and Methods

Isolates: The isolates used in this study (n=25) belong to the fungal collection of the Mycology Laboratory of the Universidade Federal de Pelotas (UFPeI) and one standard strain (CBS 101555) All isolates (=26) came from naturally infected animals in Rio Grande do Sul State, Brazil and they were identified as *P. insidiosum* through their molecular and morphological characteristics as described previously.²

***M. alternifolia* free oil and nanoemulsion:** *M. alternifolia* essential oil in its formulation of free oil was commercially obtained from Laszlo Aromatherapy Ltd, Belo Horizonte, Brazil. Essential oil components were previously determined by the manufacturer. The nanoemulsion containing 1 % *M. alternifolia* (10 mg/mL) was prepared by the spontaneous emulsification method within nanometer size range (about 200 nm), negative zeta potential, and polydispersity index below 0.25.^{6,12} *M. alternifolia* FO composition consisted of: terpinene-4-ol (40 – 52 %), γ -terpinene (6 – 20 %), α -terpinene (11 – 16 %), 1,8 cineole (1 – 2 %), terpineole (5 %), limonene (3 – 4 %), pinene (3 – 5 %), and terpinolene (1 – 5 %), according to manufacturer's specifications.

Inoculum preparation: The inoculum used in the susceptibility test was prepared from *P. insidiosum* mycelial culture (hyphae), as described previously.¹⁶ Briefly, the suspension of *P. insidiosum* inoculum was obtained by microorganism cultivation in 0.1 % yeast agar incubated at 37 °C for 96 hours. The culture was covered with 10 mL sterile distilled water and the mycelium was scraped with a sterile scalpel blade. Afterwards, this solution was transferred to a sterile 10 mL tube and the optical density was determined using a spectrophotometer adjusted to an 80 % – 85 % transmittance at 530 nm.

In vitro susceptibility test: The test used the microdilution broth method based on the M-38A2 CLSI document with modifications for phytopharmaceuticals use.^{10,11} The formulations tested were: essential oil in coarse dispersion or *M. alternifolia* free oil (FO) and essential oil associated with nanoemulsion (NE). All FO concentrations tested varied from 8.5 mg/mL to 0.02 mg/mL. From the NE stock solution (initial 1 % concentration) ten serial dilutions were prepared in RPMI medium with concentrations ranging from 10 mg/mL to 0.02 mg/mL. A 100 µL volume of each dilution for both FO and NE formulations was added to each microdilution plate well and an additional 100 µL with the same inoculum volume was put into each well. A positive control (100 µL RPMI and 100 µL inoculum) and a negative control (100 µL RPMI and 100 µL FO and NE dilution) were established for each *P. insidiosum* isolate. The plates were incubated at 37 °C in an orbital shaker incubator at 40 rpm for 48 hours. All tests were performed in triplicate. The reading of the results was performed within 48 hours of incubation and considered presence or absence of the visual hyphal growth. The lowest FO or NE concentration capable of inhibiting 100% of *P. insidiosum* growth, as compared to positive control, was considered the minimal inhibitory concentration (MIC). MIC₅₀ and MIC₉₀ were determined following previous studies.^{15,16} Additionally, the minimum fungicidal concentration (MFC) was determined by transferring an aliquot (0.1 mL of FO or NE concentration) equal to or higher than MIC into test tubes containing 0.9 mL

Sabouraud broth. After a 48 hour incubation period at 37 °C, the lowest concentration (FO or NE formulations) not showing any growth was considered the MFC.

Statistical analyses

MIC values were submitted to a normality test. As the response variable did not show normality, data were subjected to the non-parametric χ^2 test. The analyses were performed using version 8.2 SAS software package, assuming a 5 % probability.

Results

The results of *in vitro* susceptibility tests for all 26 *P. insidiosum* isolates are described in Table 1. It was observed that MIC ranged from 0.53 to 2.13 mg/mL and from 0.13 to 2.13 mg/mL for FO and NE formulations, respectively. However, MIC₅₀ was 1.06 mg/mL for both FO and NE formulations. In addition, MIC₉₀ values were 1.06 and 2.13 for NE and FO, respectively. The MFC found were equal to the MIC for most of the isolates tested. However, two isolates showed MFC 2 to 4 times higher than MIC when FO was evaluated. Similarly, two other isolates showed MFC 2 times as high as the MIC when NE was tested (data not shown).

The statistical analyses demonstrated that NE MIC values were lower as compared to FO values ($P < 0.05$).

Discussion

The antimicrobial activity of *M. alternifolia* has been widely studied against different microorganisms, including true fungi,^{13,20} bacteria,^{8,29} viruses,²⁶ and parasites.⁴ Essential oils of aromatic plants have been used in the alternative treatment of different diseases, since they

oils have low toxicity to mammalian cells, minor environmental impact and good acceptance by consumers.¹⁷

The current study evaluated the antimicrobial activity of two *M. alternifolia* formulations against *P. insidiosum*. This oomycete is a fungus-like microorganism against which antifungals available are ineffective.³⁴ In this study, the results evidenced that both FO and NE formulations of *M. alternifolia* presented *in vitro* antimicrobial activity against all *P. insidiosum* isolates tested (n=26). Other pieces of research have evaluated the susceptibility of yeast and filamentous fungi against *M. alternifolia* by using different methodologies. All of these studies have also demonstrated the antifungal activity of this plant.^{20,21} The antimicrobial potential of *M. alternifolia* has been attributed to its major components (terpinene-4-ol, 1,8 cineole, α terpineole, terpinolene, terpinene- α - and - γ), which represent approximately 90 % of *M. alternifolia* oil structure.⁷ This composition was also present in the oil formulations used in this study.

It was observed that NE formulation presented lower MIC₉₀ than FO (P<0.05). It is believed that the best results obtained with NE could be attributed to oil stability in nanoemulsion. The instability of *M. alternifolia* essential oil is due to its volatile components such as alcohols, esters, aldehydes, ketones and phenols, among others, present in the leaves, flowers, stems, roots and seeds of the plant.³ Thus, nanostructures show greater efficiency in stabilizing the final product, as well as are able to protect the drug from enzymatic dissociation of chemical or immunological origin.⁵

Previous *in vitro* studies have shown that microorganisms of the Class Oomycota are susceptible to the action of essential oils from plants of the family Lamiaceae.^{23,33,36} Similarly, our research team reported the antimicrobial activity of essential oils of *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Mentha piperita*, and *Rosmarinus officinalis* against *P. insidiosum* isolates.¹⁷ In addition, other researchers have reported the antifungal activity of the root extract of *Clausena harmandiana* against this oomycete.³⁴ Studies have also shown that coumarinoids from *Micromelum falcatum* fruit can inhibit *P. insidiosum* mycelial growth.³⁵ Furthermore, another study also obtained *in*

vitro activities of a combination of carvacrol and thymol with antibiotics and antifungal agents against *P. insidiosum* isolates.²² Our research team has recently demonstrated *in vivo* activity of a combination of a topical *O. vulgare* and *M. piperita* formulation with immunotherapy in the treatment of experimental cutaneous pythiosis.¹⁷ However, studies using *M. alternifolia* against *P. insidiosum* have not been so far reported.

In the present study the NE formulation of *M. alternifolia* showed superior antimicrobial activity as compared to FO ($P < 0.05$). The inhibitory activity of FO from *M. alternifolia* associated with nanocarriers has also been demonstrated in dermatophytes¹³ and *Rhodococcus equi*.²⁹ Thus, the phytotherapeutic potential of *M. alternifolia* is promising and its use in veterinary medicine should be considered.

Conclusion

This study demonstrates *in vitro* antimicrobial activity of *M. alternifolia* in its FO and NE formulations against Brazilian isolates of *P. insidiosum*. In addition, *M. alternifolia* oil can be used as an additional therapy in the treatment of pythiosis. However, further studies are needed to assess its applicability in clinical pythiosis.

Conflicts of interest

None of the authors of this manuscript has a financial or personal relationship with other people or organizations that could inappropriately influence the content of this work.

Funding

Financial support was provided by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) [Process: 1933-2551/13-O-SIAFEM] and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) [Process: 442,020/2014 -7].

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), for their support and student and researcher's grants.

References

1. Anton N, Benoit JP, Saulnier P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. *J Control Release*. 2008; 128: 185–199.
2. Azevedo MI, Pereira DIB, Botton AS, Costa MM, Mahl CD, Alves SH, Santurio JM. *Pythium insidiosum*: morphological and molecular identification of Brazilian isolates. *Pesqui Vet Bras*. 2012; 32: 619-22.
3. Bakkali F, Averbeck D, Averbeck S, Idaomar M. Biological effects of essential oils a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46: 446-475.
4. Baldissera MD, Silva AS, Oliveira CBA, Santos RCV, Rodrigo A., Vaucher RA, Raffin RP, Gomes P, Dambros MGC, Milette LC, Boligon AA, Athayde ML, Monteiro SG. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. *Exp Parasitol*. 2014; 141: 21–27.
5. Barrat GM. Therapeutic application of colloidal drug carriers. *Pharmaceutical Sci Tech Today*. 2000; 3: 163-171.
6. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *Int J Pharm*. 2004; 280: 241–251.

7. Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gaschromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). J Agric and Food Chem. 1989; 37: 1330-1335.
8. Carson CF, Mee BJ, Riley TV. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother. 2002; 46: 1914–1920.
9. Chifiriuc C, Grumezescu V, Grumezescu AM, Saviuc C, Lazăr V, Andronescu E. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. Nanoscale Res Lett. 2012;7: 209.
10. Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, Rodrigues MR, Meireles MCA. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. Arq Bras Med Vet Zootec. 2010; 62: 1291-1294.
11. Clinical Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard CLSI Document M38-A2. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
12. Flores FC, Ribeiro RF, Ourique AF, Rolim CMB, Silva CB, Pohlmann AR, Beck RCR, Guterres SS. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. Quím Nov 2011; 34:968–972.
13. Flores FC, Lima JA, Ribeiro RF, Alves SH, Rolim CMB, Beck RCR, Silva CB. Antifungal activity of nanocapsule suspensions containing tea tree oil on the growth of *Trichophyton rubrum*. Mycopathologia. 2013; 175: 281-286.
14. Foil CSO. Update on pythiosis (Oomycosis). The North American Veterinary Conference. 1996; 57-63.
15. Fonseca AOF, Pereira DIB, Jacob RG, Maia Filho FS, Oliveira DH, Maroneze BP, Valente JSS, Osório LG, Botton SA, Meireles MCA. In vitro susceptibility of Brazilian

Pythium insidiosum isolates to essential oils of Some *Lamiaceae* family species. Mycopathologia 2014; 179: 253-258.

16. Fonseca AOS, Pereira DIB, Maia Filho FS, Osório LG, Maroneze BP, Valente JSS, Pötter L, Meireles MCA. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. J Antimicrob Chemother 2014; 69: 1564-1567.

17. Fonseca AOS, Pereira DIB, Botton SA, Pötter L, Sallis ESV, Júnior SFV, Filho FSM, Zambrano CG, Maroneze BP, Valente JSS, Baptista CT, Braga CQ, Dal Ben V, Meireles MCA. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. Vet Microbiol. 2015; 5: 265-269.

18. Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L. *Pythium insidiosum*: an overview. Vet Microbiol. 2010; 146: 1-16.

19. Grooters, AM. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. Vet Clin North Am. 2003; 33: 695-720.

20. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. J Antimicrob Chemother. 2002; 50: 195-199.

21. Hammer KA, Carson CF, Riley TV. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J. Appl Microbiol. 2003; 95: 853–860.

22. Jesus FP, Ferreira L, Bizzi KS, Loreto ES, Pilotto MB, Ludwing A, Alves SH, Zanette RA, Santurio JM. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. J Mycol Med. 2014; 25: 89-93.

23. Lee SO, Choi GJC, Jang KS, Lim HK, Cho KY, Kim JC. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. Plant Pathol. 2007; 23: 97-102.

24. Manaia, EB, Kaminski RCK, Oliveira AG, Correa MA, Chiavacci LA. Multifunction hexagonal liquid-crystal containing modified surface TiO₂ nanoparticles and terpinen-4-ol for controlled release. *Int J Nanomedicine*. 2015; 10: 811-819.
25. Marini, VG, Martelli SM, Zornio CF, Caon T, Simões CMO, Micke GA, Oliveira MAL, Machado VG, Soldi V. Biodegradable nanoparticles obtained from zein as a drug delivery system for terpinen-4-ol. *Quím Nova*. 2014; 37: 839-843.
26. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. *Microbiol Immunol*. 2003; 47: 681-684.
27. Oliveira JS, Aguiar TA, Mezadri H, Santos ODH. Attainment of hydrogel-thickened nanoemulsions with tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) and retinyl palmitate. *African J Biotechnol*. 2011; 10: 13014-13018.
28. Pearce AL, Finlay-Jones JJ, Hart PH. Reduction of nickelinduced contact hypersensitivity reactions by topical tea tree oil in humans. *Inflamm Res*. 2005; 54: 22-30.
29. Sagave L, Gressler LT, Flores FC, Silva CB, Vargas APC, Lovato M, Sangioni LA, Pötter L, Botton SA. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2015; 67:221-226.
30. Santos RCV, Lopes LQS, Alves CFS, Fausto VP, Pizzutti K, Barboza V, Souza ME, Raffin RP, Gomes P, Takamatsu D, Morinaga Y, Boligon AA, Athayde ML, Felippi CC, Vaucher RA. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. *J Asia Pac Entomol*. 2014; 17: 343–347.
31. Schaffazick SR, Guterres SS. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. *Quím Nova*. 2003; 26: 726-737.

32. Souza ME, Lopes LQS, Vaucher RA, Mário DN, Alves SH, Agertt VA, Bianchini BV, Felicidade SI, Campus MMA, Boligon AA, Athayde ML, Santos CG, Raffin RP, Gomes P, Santos RCV. Antimycobacterial and antifungal activities of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles. J Drug Del Sci Tech. 2014; 24: 559-560.
33. Soyly EM, Soyly S, Kurt S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. Mycopathologia. 2006; 161: 119-128.
34. Sriphana U, Thongsri Y, Ardwichai P, Poopasit K, Prariyachatigul C, Simasathiansopion S, Yenjai C. New lignan esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. Fitoterapia. 2013; 91: 39-43.
35. Suthiwong J, Sriphana U, Thongsri Y, Promsuwan P, Prariyachatigul C, Yenjai C. Coumarinoid from the fruits of *Micromelum facatum*. Fitoterapia. 2014; 94: 134-141.
36. Wogiatzi E, Gougoulas N, Papachatzis A, Vagelas I, Chouliaras N. Chemical composition and antimicrobial effects of greek *Origanum* species essential oil. Biotechnol Biotechnol Eq. 2009; 23: 1322-1324.

Tabela 1: *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* (n=26) against *M. alternifolia* in free oil (FO) and nanoemulsion (NE) formulations

MIC (mg/mL) of each formulation and isolates (%)							
<i>M. alternifolia</i> formulation	0.13	0.27	0.53	1.06	2.13	MIC ₅₀ ^a	MIC ₉₀ ^b
FO			04 (15.4)	17 (65.4)	05 (19.2)	1.06	2.13
NE	01 (3.9)	03 (11.5)	06 (23.1)	14 (53.8)	02 (7.7)	1.06	1.06

^a Minimal concentration to inhibit the growth of 50 % of isolates.

^b Minimal concentration to inhibit the growth of 90 % of isolates.

5 Manuscrito 2

Manuscrito em construção a ser submetido à revista Mycopathologia:

http://www.springer.com/life+sciences/microbiology/journal/11046?detailsPage=placi_1890368

Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*

Júlia de Souza Silveira Valente • Anelise Oliveira Fonseca • Laura Bedin Denardi •
Vanessa Silveira Dal Ben • Fernando Souza Maia Filho • Cristiane Telles Baptista •
Caroline Quintana Braga • Sidney Hartz Alves • Sônia de Avila Botton • Daniela Isabel
Brayer Pereira

Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*

***In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to combinations of *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils**

Júlia de Souza Silveira Valente • Anelise Oliveira Fonseca • Laura Bedin Denardi • Vanessa Silveira Dal Ben • Fernando Souza Maia Filho • Cristiane Telles Baptista • Caroline Quintana Braga • Sidney Hartz Alves • Sônia de Avila Botton • Daniela Isabel Brayer Pereira

J. S. Valente • V. S. Dal Bem • F. S. Maia-Filho • C. T. Baptista • C. Q. Braga • D. I. B. Pereira

Laboratório de Micologia. Universidade Federal de Pelotas. Campus Capão do Leão, s/nº, Pelotas, RS 96010-900. Brazil. E-mail: danielabrayer@gmail.com

L. B. Denardi • S. H. Alves • Sônia de Avila Botton

Laboratório de Pesquisas Micológicas. Universidade Federal de Santa Maria. Campus Universitário Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

Resumo

Pythium insidiosum é o agente da pitiose, uma grave doença piogranulomatosa emergente que afeta os mamíferos cujo tratamento não está completamente estabelecido. Falhas com as terapias antifúngicas convencionais são, em parte, justificadas pela ausência do ergosterol na composição de membrana citoplasmática deste oomiceto. Os óleos essenciais têm sua atividade antimicrobiana atribuída ao seu mecanismo de ação o qual atua em nível de membrana citoplasmática. O presente estudo investigou o perfil da suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* e em suas combinações. Os testes de suscetibilidade foram realizados conforme o protocolo M38-A2 (CLSI, 2008) e as combinações avaliadas pela técnica de *checkerboard* para microdiluição. Todos os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*, destacando-se a melhor atividade de *O. vulgare*. Não observou-se efeito antagônico para as combinações testadas, ressaltando-se a combinação de *M. piperita* e *O. vulgare* que resultou em 65% de sinergismo. Este estudo evidenciou a suscetibilidade de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *M. piperita*, *M. alternifolia* e *O. vulgare*, bem como as

suas combinações, sendo o primeiro estudo *in vitro* que avaliou combinações de óleos essenciais frente a *P. insidiosum*.

Palavras-chave: pitiose • oomiceto • árvore-do-chá • menta • orégano • sinergismo

Abstract

Pythium insidiosum is the etiologic agent of pythiosis, a severe and emerging disease that affects mammals. The failures with conventional antifungal therapies are partially justified by the absence of ergosterol in the plasma membrane of this oomycete. Despite the advancement of research, the treatment of pythiosis is not fully established. The present study investigated *in vitro* susceptibility profile of Brazilian isolates of *P. insidiosum* (n = 20) against *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils, as well as their combinations. Susceptibility tests were performed according to M38-A2 (CLSI, 2008) protocol and the combinations were evaluated by checkerboard microdilution method. All essential oils showed antimicrobial activity against *P. insidiosum*, emphasizing the greatest activity of *O. vulgare*. It was observed synergistic effect and/or indifferent for all combinations evaluated, highlighting *M. piperita* and *O. vulgare* combination with 65% of synergism. This is the first study that reported *in vitro* combinations of essential oils against *P. insidiosum* and highlights the susceptibility of this oomycete to *M. alternifolia*, *M. piperita* and *O. vulgare* essential oils, as well as their combinations.

Key words: pythiosis • oomycete • tea tree • mint • oregano • synergism

Introdução

Pythium insidiosum é um micro-organismo similar aos fungos filamentosos, de relevância na fitopatologia e medicina humana e veterinária, uma vez que causa a pitiose em mamíferos, uma enfermidade eminentemente fatal. Diferente dos fungos verdadeiros, este oomiceto carece de ergosterol em sua membrana citoplasmática, principal alvo dos fármacos antifúngicos, o que em parte, justifica a ineficácia dos tratamentos antifúngicos empregados na pitiose em animais e no homem [1]. Dependendo da espécie de mamífero infectada, a pitiose pode manifestar-se nas formas cutânea, gastrointestinal, oftálmica ou sistêmica. Embora a cirurgia,

imunoterapia e agentes antimicrobianos sejam métodos empregados para o tratamento da enfermidade, o sucesso desses procedimentos é bastante variável e em vários casos ocorre a morte do animal afetado [2].

Devido às dificuldades encontradas para o tratamento desta grave doença, nas últimas décadas, diversos grupos de pesquisa se engajaram em estudos, cujo objetivo foi avaliar a suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *P. insidiosum*, bem como buscar fármacos com diferentes princípios ativos que apresentem atividade antimicrobiana frente a este importante oomiceto [3-16]. Neste contexto, ressaltam-se os estudos *in vitro* com compostos bioativos de óleos essenciais de plantas medicinais, os quais têm mostrado resultados promissores na terapia antimicrobiana contra *P. insidiosum* [11,15,17-18]. Adicionalmente, estudos avaliando as associações ou combinações de agentes antimicrobianos, incluindo compostos bioativos oriundos de plantas, em testes de suscetibilidade *in vitro* frente a *P. insidiosum* têm evidenciado a ocorrência de interações sinérgicas entre os agentes testados [78, 10-11,14]. Similarmente, pesquisas relataram o benefício da combinação de óleo essencial de *Origanum vulgare* e *Mentha piperita* no tratamento da pitiose experimental em coelhos, evidenciando que a associação de terapias pode ser uma vantagem no tratamento da pitiose [16].

O presente estudo investigou o perfil da suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* frente aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* e às suas combinações.

Material e Métodos

Isolados

Os testes de suscetibilidade foram realizados empregando-se 19 isolados de *P. insidiosum*, oriundos de animais naturalmente infectados, do estado do Rio Grande do Sul, Brasil e uma cepa padrão (CBS 101555), gentilmente cedida pelo Laboratório de Pesquisas Micológicas, Universidade Federal de Santa Maria. Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Micologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas (UFPel). A identificação foi realizada pelas características macro e micro morfológicas e confirmada por Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) e sequenciamento de DNA, conforme previamente descrito [19].

Preparação do inóculo

O inóculo utilizado nos testes de suscetibilidade foi preparado a partir de cultura micelial de *P. insidiosum*, conforme descrito [20]. Brevemente, a suspensão do inóculo foi obtida a partir do cultivo do oomiceto em agar levedura 0,1%, incubado a 37°C por 96 horas. Posteriormente, a cultura foi inundada com 10

mL de água destilada estéril e o micélio raspado com auxílio de lâmina de bisturi esterilizada. A solução obtida foi transferida para um tubo e o inóculo ajustado em espectrofotômetro a uma transmitância de 80 a 85% a 530 nm. Para a realização dos testes de suscetibilidade o inóculo foi previamente diluído 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS (ácido morfolínico propanosulfônico).

Obtenção dos óleos essenciais

Os óleos essenciais utilizados neste estudo incluíram: *Melaleuca alternifolia*, obtido comercialmente da Laszlo Aromaterapia Ltda, Belo Horizonte, Brasil; *Origanum vulgare* e *Mentha piperita*, obtidos da Ferquima Indústria e Comércio Ltda, São Paulo-SP, Brasil. Os componentes dos óleos essenciais foram previamente determinados pelo fabricante.

Testes de suscetibilidade *in vitro*

O teste de suscetibilidade empregou o método de microdiluição em caldo, seguindo o protocolo M38-A2 do CLSI [21], adaptado para testes com fitofármacos [22].

Soluções estoque dos óleos essenciais foram preparadas a partir da homogeneização dos óleos essenciais em RPMI adicionado de 0,05mL de Tween 80. A partir da solução-estoque de *M. alternifolia* que continha 8.500µg/mL e da solução de *O. vulgare* e *M. piperita* que continham 56.000µg/mL, foram preparadas diluições seriadas em meio RPMI 1640 tamponado a pH 7.0 com 0,165M MOPS, as quais variaram de 4.250 µg/mL to 30 µg/mL para *M. alternifolia* e de 14.000 a 25 µg/mL para *M. piperita* e *O. vulgare*. Alíquotas de 100µL de cada diluição foram dispensadas a cada poço das microplacas e adicionado de igual volume do inóculo.

As combinações entre os óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare*, *M. piperita* e *M. alternifolia* e *M. alternifolia* e *O. vulgare* foram realizadas conforme o método de *cherkerboard* descrito para microdiluição em caldo [21, 23]. Neste teste, as diluições variaram de 14.000-110 µg/mL. Em cada poço da microplaca utilizou-se um volume de 50µL de cada óleo essencial e adicionado de 100µL de inóculo.

Para cada teste foi utilizado um controle positivo (inóculo + RPMI) e negativo (óleo essencial + RPMI). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40 rpm, durante 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A leitura foi visual e levou em consideração o crescimento ou não de hifas. A menor concentração do óleo essencial 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 fungicida mínima (CFM). 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 do óleo que não evidenciou crescimento foi considerada a CFM.

Baseado no Índice de Fração Inibitória Mínima (FICI), as combinações foram interpretadas como sinérgica ($FICI \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < FICI \leq 4$) ou antagonista ($FICI > 4$) [24], utilizando a fórmula $FICI = (MIC\ A\ na\ combinação / MIC\ A\ isolado) + (MIC\ B\ na\ combinação / MIC\ B\ isolado)$, onde MIC A e MIC B indicam o MIC de cada óleo essencial avaliado.

Resultados

Os componentes majoritários dos óleos essenciais empregados neste estudo tiveram suas composições informadas pelos fabricantes e consistiram de *M. piperita*: 1-mentol (33%), mentona (30%), acetato de mentila (4%), eucaliptol (6%); *M. alternifolia*: terpineno-4-ol (40 – 52 %), γ -terpineno (6 – 20 %), α -terpineno (11 – 16 %), 1,8 cineol (1 – 2 %), terpineol (5 %), limoneno (3 – 4 %), pineno (3 – 5 %), terpinoleno (1 – 5 %); e, *O. vulgare*: carvacrol (71%), timol (3%), γ -terpineno (4,5%), para-cimeno (3,5%) e β -carfiofileno (4%).

Os valores das CIM para os óleos essenciais individuais estão listados na Tabela 1. Evidenciou-se que todos os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*. Dentre os óleos essenciais, observou-se que o óleo de *O. vulgare* apresentou a melhor atividade antimicrobiana *in vitro*, com faixas de CIM que variaram de 50 µg/mL a 1750 µg/mL, concentração inibitória capaz de inibir 50% dos isolados testados (MIC_{50}) de 220 µg/mL e MIC_{90} (inibição de 90% dos isolados) de 870 µg/mL. As concentrações fungicidas mínimas dos óleos essenciais testados foram iguais às CIM para todos os isolados do oomiceto.

A suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente às combinações dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* está demonstrada na Tabela 2. A combinação dos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare* evidenciaram sinergismo em 65% (13/20) isolados de *P. insidiosum* e indiferença em 35% (7/20). Na combinação entre *M. piperita* e *M. alternifolia* verificou-se sinergismo em 50% (10/20) dos isolados e indiferença em 50% (10/20). Quando o óleo essencial de *M. alternifolia* foi combinado com *O. vulgare* observou-se sinergismo em 45% (9/20) dos isolados de *P. insidiosum* e indiferença em 55% (11/20). Antagonismo não foi evidenciado em nenhuma das combinações testadas.

Discussão

A pitiose é uma grave doença emergente que afeta os animais e humanos e requer atenção, uma vez que há limitações nas opções terapêuticas. As falhas no tratamento utilizando terapias antifúngicas com fármacos convencionais é, em parte, justificada pela ausência do ergosterol na composição de membrana citoplasmática de *P. insidiosum* [1-2]. Observa-se que apesar do avanço das pesquisas em busca de terapias eficazes, o tratamento da pitiose ainda não está completamente estabelecido. Neste sentido, estudos envolvendo novas terapias que venham a colaborar no tratamento dessa enfermidade são fundamentais.

A utilização de plantas medicinais é uma prática antiga e se destaca pelas suas propriedades medicinais que incluem ações antimicrobianas, analgésicas, anestésicas, anti-inflamatórias e espasmolíticas [25-26]. Estudos empregando plantas medicinais comprovaram o potencial antimicrobiano frente aos vírus [27], bactérias [28], parasitos [29], fungos [22, 30] e oomicetos, incluindo *P. insidiosum* [11,15,17-18].

Neste trabalho, todos os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade anti-*P.insidiosum*. As CIM individuais dos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare* frente a *P. insidiosum* obtidos foram similares aos resultados relatados por Fonseca et al. [15]. Previamente, o nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade inibitória de *M. alternifolia* frente a este oomiceto e obteve resultados comparáveis ao presente estudo (dados não publicados).

Este é o primeiro estudo *in vitro* que avaliou combinações de óleos essenciais frente a *P. insidiosum*. Embora Fonseca et al [16] não tenham avaliado *in vitro* a combinação de *M. piperita* e *O. vulgare*, demonstrando efeito sinérgico ou indiferença *in vivo* ao tratar coelhos com pitiose experimental. As combinações de carvacrol ou timol foram avaliadas com fármacos antibacterianos e antifúngicos, porém não foram testadas as combinações dos compostos bioativos entre si [11]. Na presente pesquisa, as combinações de óleos essenciais avaliadas evidenciaram efeito sinérgico para todas as combinações, não havendo nenhum efeito antagônico. Os efeitos sinérgicos das combinações dos óleos testados são comparáveis aos resultados obtidos por outros estudos *in vitro* que empregaram a combinação de fármacos com distintos mecanismos de ação antimicrobiana frente a *P. insidiosum* [7,8,10,14]. No geral, estes dados mostram que as combinações entre diferentes compostos podem ser vantajosas para o tratamento da pitiose.

Os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais podem ser atribuídos aos seus mecanismos de ação que atuam em nível de membrana citoplasmática. As implicações destes mecanismos envolvem a lise e a perda da integridade da membrana devido às alterações que determinam a saída de íons (hidrogênio, potássio e cálcio), gerando danos aos processos essenciais à sobrevivência da célula [31-32]. Todavia, as diferenças na composição

química dos óleos essenciais podem influenciar a suscetibilidade dos micro-organismos [33]. Desta forma, a atividade antimicrobiana de *O. vulgare* é atribuída à presença de compostos majoritários como carvacrol, tymol, 4-terpineol e linalool [15,34-35]. No óleo essencial de *M. piperita* os componentes responsáveis pela sua atividade antimicrobiana são o mentol e a mentona [15,36-37]. No caso de *M. alternifolia* a atividade antimicrobiana é atribuída aos compostos terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α terpineol, terpinoleno e α - e γ -terpineno [38]. Em nosso estudo, a composição dos óleos essenciais estava de acordo aos relatados previamente na literatura [15, 34-38]. Os resultados das combinações observadas neste estudo foram, em sua maioria, sinérgicas, sugerindo que há uma interação entre esses compostos. Possivelmente, esta interação possa ter sido ocasionada pela melhor penetração de um óleo quando favorecida pela ação dos compostos do outro óleo na membrana citoplasmática do micro-organismo, ou ainda, pela interação de transporte entre os componentes facilitando o acesso dos óleos à membrana citoplasmática do oomiceto. Todavia estas hipóteses demandam futuros estudos para a sua comprovação.

Conclusão

Este estudo evidencia que isolados brasileiros de *P. insidiosum* são suscetíveis aos óleos essenciais de *M. piperita*, *M. alternifolia* e *O. vulgare* individualmente e nas suas combinações. Embora, os óleos essenciais e suas combinações representem uma nova proposta de terapia para a pitiose, mais pesquisas são requeridas para avaliar a implicação destas terapias no tratamento da pitiose clínica.

Referências

1. Mendoza L, Vilela R. The mammalian pathogenic oomycetes. Current Fungal Infection Reports. 2013;7:198-208.
2. Gastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM, Exel TK, Pegge, RBG, Scheurwater J, Vilela R, Mendoza L. *Pythium insidiosum*: an overview. Vet. Microbiol. 2010;146:1–16.
3. Shenep JL, English BK, Kaufman L, Pearson TA, Thompson JW, Kaufman RA, Frisch G, Rinaldi MG. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. Clinical Infectious Disease. 1998;27: 1388-93.
4. Rivierre C, Laprie C, Guiard-Marigny O, Bergeaud P, Berthelemy M, Guillot J. Pythiosis in Africa. Emerg Infect Dis. 2005;11:479-81.

5. Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH, Argenta JS, Potter L, Spanamberg A, Ferreiro L. Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother.* 2007;60:1168–71.
6. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH, Pereira DI, Cavalheiro AS, Spanamberg A, Ferreiro L. In vitro activities of voriconazole, itraconazole, and terbinafine alone or in combination against *Pythium insidiosum* isolates from Brazil. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008;52:767-9.
7. ArgentaJS, Alves SH, Silveira F, Maboni G, Zanette RA, Cavalheiro AS, Pereira PL, Pereira DI, Sallis ES, Pötter L, Santurio JM, Ferreiro L. In vitro and in vivo susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 2012;157:137-42.
8. Cavalheiro AS, Zanette AR, Spader TB, Lovato L, Azevedo MI, Botton S, Alves SH, Santurio JM. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 2009;137:408-11.
9. Loreto ES, Alves SH, Santurio JM, Nogueira CW, Zeni G. Diphenyl diselenide in vitro and in vivo activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 2011; 156:222-6.
10. Jesus FP, Loreto ÉS, Ferreiro L, Alves SH, Driemeier D, Souza SO, França RT, Lopes ST, Pilotto MB, Ludwig A, Azevedo MI, Ribeiro TC, Tondolo JS, Santurio JM. In vitro and in vivo antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;60:87-91.
11. Jesus FP, Ferreiro L, Bizzi KS, Loreto ÉS, Pilotto MB, Ludwig A, Alves SH, Zanette RA, Santurio JM. In vitro activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med.* 2015;25:89-93.
12. Dória RG, Freitas SH, Linardi RL, Mendonça FS, Arruda LP, Boabaid FM, Valadão CA. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of amphotericin B. *Vet Surg.* 2012;41:759-65.
13. Pereira DIB, Botton SA, Azevedo MI, Motta MA, Lobo RR, Soares MP, Fonseca AOS., Jesus FPK, Alves SH, Santurio JM. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. *Mycopathologia* 2013;176:309–15.
14. Zanette RA, Jesus FPK, Pilotto MB, Weiblen C, Potter L, Ferreiro L, Alves SH, Santurio JM. Miconazole alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med.* 2015;25:91-4.

15. Fonseca AOS, Pereira DIB, Jacob RG, Maia Filho FS, Oliveira DH, Maroneze BP, Valente JSS, Osório LG, Botton SA, Meireles MCA. In vitro susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some *Lamiaceae* family species. *Mycopathologia*. 2015;179:253-8.
16. Fonseca AO, Pereira DI, Botton SA, Pötter L, Sallis ES, Júnior SF, Filho FS, Zambrano CG, Maroneze BP, Valente JS, Baptista CT, Braga CQ, Ben VD, Meireles MC. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Vet Microbiol*. 2015;178:265-9.
17. Sriphana U, Thongsri Y, Ardwichai P, Poopasit K, Prariyachatigul C, Simasathiansophon C. New lignin esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. *Fitoterapia*. 2013;91:39-43.
18. Suthiwong J, Sriphana U, Thongsri Y, Promsuwan P, Prariyachatigul C, Yenjai C. Coumarinoid from the fruits of *Micromelum facatum*. *Fitoterapia*. 2014;94:134-141.
19. Azevedo MI, Pereira DIB, Botton SA, Costa MM, Mahl CD, Alves SH, Santurio JM. *Pythium insidiosum*: Morphological and molecular identification of Brazilian isolates. *Pesq. Vet. Bras*. 2012; 32:619-622.
20. Fonseca AOS, Pereira DIB, Maia Filho FS, Osório LG, Maroneze BP, Valente JSS, Potter L, Meireles MCA. In vitro susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. *J Antimicrob Chemth*. 2014;69:1564-67.
21. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. And ed. Wayne: M38-A2 CLSI; 2008.p.144.
22. Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO, Xavier MO, Santin R, Nascente PS, Rodrigues MR, Meireles MCA. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq Bras Med Vet Zootec*. 2010; 62:1291-4.
23. Hsieh MH, Yu CM, Yu VL, Chow JW. Synergy assessed by checkerboard - a critical analysis. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 1993;16:343-9.
24. Johnson MD, McDougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JR, Rex JH. Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemoter*. 2004;48:693-15.
25. Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL . Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. *Braz J Microbiol*. 2000;31:247-56.
26. Bakkali F, Averbeck D, Averbeck S, Idaomar M. Biological effects of essential oils a review. *Food Chem Toxicol*. 2008; 46:446-475.

27. Minami M, Kita M, Nakaya T, Yamamoto T, Kuriyama H, Imanishi J. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication in vitro. *Microbiol Immunol.* 2003;47:681–4.
28. Sagave L, Gressler LT, Flores FC, Silva CB, Vargas APC, Lovato M, Sangioni LA, Pötter L, Botton SA. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2015;67:221-6.
29. Baldissera MD, Silva AS, Oliveira CB A , Santos RCV, Rodrigo A. Vaucher RA, Raffin RP, Gomes P, Dambros MGC, Miletti LC, Boligon AA, Athayde ML, Monteiro SG. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* in vitro and in vivo used mice as experimental model. *Exp Parasitol.* 2014;141:21–27.
30. Cleff MB, Meinerz AR, Xavier M, Schuch LF, Meireles MCA, Rodrigues MRA, Mello JRB. In vitro susceptibility of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Brazilian Journal of Microbiology.* 2010;41:116-123.
31. Dorman HJD.; Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol.* 2000;88:308-16.
32. Rao A, Zang V, Muend S, Rao R. Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2010;54:5062-69.
33. Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantin C, Muzzoli M, Dehesa M, Romagnoli C, Sacchetti G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem.* 2004;85:415–421.
34. Soylu EM, Soylu S, Kurt S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Pytophthora infestans*. *Mycophatologia.* 2006;161:119-26.
35. Hussain AI, Anwar F, Rasheed S, Nigam PS, Jannah O, Sarker SD. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. *Rev Bras Farmacogn.* 2011;21:943-52.
36. Iscan G, Kirimer N, Kurkuoglu M, Baser KH, Demirci F. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. *J Agric Food Chem.* 2002;50:3943-6.
37. Tyagi, A.K.; Malik, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. *Food control.* 2011;22:1707-14.
38. Brophy JJ, Davies NW, Southwell IA, Stiff IA, Williams LR. Gaschromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). *J Agric and Food Chem.* 1989;37:1330-35.

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* (n=20) aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*.

Óleo essencial	Faixa de variação do MIC	MIC ₅₀ ^a	MIC ₉₀ ^b
<i>M. alternifolia</i>	531,5-2125	1062,5	2125
<i>M. piperita</i>	110-3500	445	3500
<i>O. vulgare</i>	50-1750	220	870

^a Concentração inibitória mínima que inibiu 50% dos isolados;

^b Concentração inibitória mínima que inibiu 90% dos isolados.

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (MA), *Mentha piperita* (MP) e *Origanum vulgare* (OV).

<i>P.insidiosum</i>									
	CIM ¹ da combinação (µg/mL)								
	MP/OV	FICI ²	IN ³	MP/MA	FICI	IN	MA/ OV	FICI	IN
PI01	437,5/109,4	1,9	I	218,7/437,5	0,9	I	437,5/109,4	1,4	I
PI02	109,4/218,7	2,4	I	109,4/437,5	0,9	I	437,5/109,4	1,4	I
PI 04	218,7/109,4	3,1	I	109,4/437,5	1,3	I	437,5/109,4	1,4	I
PI 08	437,5/109,4	2,4	I	109,4/437,5	1,8	I	875/109,4	3,8	I
PI 09	437,5/218,7	0,3	S	109,4/437,5	0,6	I	437,5/109,4	2,5	I
PI 11	218,7/109,4	0,5	S	109,4/437,5	1,3	I	109,4/218,7	1,2	I
PI 14	218,7/109,4	1,4	I	109,4/437,5	0,7	I	218,7/109,4	0,6	I
PI 16	218,7/109,4	3,1	I	109,4/437,5	0,7	I	437,5/109,4	2,3	I
PI 18	218,7/109,4	1,49	I	109,4/437,5	0,4	S	875/109,4	1,4	I
PI 21	109,4/218,7	0,3	S	109,4/437,5	0,6	I	109,4/218,7	0,2	S
PI 25	437,5/109,4	0,3	S	109,4/437,5	0,4	S	109,4/218,7	0,3	S
PI 26	218,7/218,7	0,3	S	109,4/437,5	0,7	I	437,5/109,4	0,7	I
PI 28	437,5/218,7	0,3	S	875/109,4	0,3	S	109,4/218,7	0,3	S
PI 31	109,4/875	0,5	S	109,4/437,5	0,4	S	109,4/218,7	0,2	S
PI 32	875/109,4	0,3	S	109,4/437,5	0,4	S	109,4/218,7	0,3	S
PI 33	218,7/218,7	0,3	S	109,4/437,5	0,4	S	218,8/109,4	0,3	S
PI 34	437,5/218,7	0,5	S	218,7/437,5	0,5	S	109,4/437,5	0,6	I
PI 35	437,5/218,7	0,3	S	218,7/437,5	0,2	S	875/109,4	0,5	S
PI 36	875/109,4	0,3	S	109,4/437,5	0,4	S	437,5/109,4	0,5	S
CBS ⁶	218,7/218,7	0,5	S	109,4/437,5	0,5	S	218,7/218,7	0,4	S

¹MIC, concentração inibitória mínima; ²FICI, índice de concentração inibitória fracional; ³IN, interpretação; ⁴I, indiferença; ⁵S, sinergismo; ⁶CBS, 101555.

6 Manuscrito 3

Manuscrito em construção a ser submetido no Journal Antimicrobial Chemotherapy

[http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jac/for_authors/#Article types and format](http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jac/for_authors/#Article_types_and_format)

Atividade *in vitro* de antifúngicos combinados a óleos essenciais frente ao oomiceto *Pythium insidiosum*

Júlia de Souza Silveira Valente • Anelise Oliveira Fonseca • Laura Bedin Denardi •
Vanessa Silveira Dal Ben • Fernando Souza Maia-Filho • Caroline Quintana Braga •
Sidney Hartz Alves • Sônia de Avila Botton • Daniela Isabel Brayer Pereira

Atividade *in vitro* de antifúngicos combinados a óleos essenciais frente ao oomiceto

Pythium insidiosum

In vitro* activity of antifungal combined with essential oils against the oomycete *Pythium

insidiosum

Júlia de Souza Silveira Valente • Anelise Oliveira Fonseca • Laura Bedin Denardi • Vanessa Silveira Dal Ben • Fernando Souza Maia Filho • Cristina Zambrano • Caroline Quintana Braga • Sidney Hartz Alves • Sônia de Avila Botton • Daniela Isabel Brayer Pereira
J. S. Valente • V. S. Dal Bem • F. S. Maia-Filho • C. G. Zamabrano • C. Q. Braga • D. I. B. Pereira

Laboratório de Micologia. Universidade Federal de Pelotas. Campus Capão do Leão, s/nº, Pelotas, RS 96010-900. Brazil. e-mail: danielabraye@gmail.com

L. B. Denardi • S. H. Alves • S. A. Botton

Laboratório de Pesquisas Micológicas. Universidade Federal de Santa Maria. Campus Universitário Camobi, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.

Resumo

Objetivos: Este estudo objetivou investigar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente às combinações dos fármacos antifúngicos, terbinafina ou itraconazol com os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*.

Métodos: As combinações *in vitro* dos antifúngicos com os óleos essenciais foram avaliadas usando o método de *checkerboard* para microdiluição frente a 20 isolados brasileiros de *P.*

insidiosum. Os testes foram realizados conforme o protocolo M38-A2 e as interpretações das combinações foram baseadas nos valores do Índice de Fração Inibitória Mínima (FICI).

Resultados: Acentuado efeito sinérgico foi observado nas combinações do itraconazol com os óleos essenciais, não havendo antagonismo em nenhuma das interações. As combinações de terbinafina com os óleos essenciais resultaram indiferentes ou antagônicas.

Conclusões: A combinação entre compostos bioativos oriundos de plantas com fármacos antifúngicos podem constituir uma alternativa terapêutica a ser aplicada no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. Estudos envolvendo novos protocolos terapêuticos com tais combinações são necessários.

Palavras-chave: pitiose • azólicos • *Melaleuca alternifolia* • *Mentha piperita* • *Origanum vulgare*

Abstract

Objectives: This study aimed to investigate *in vitro* susceptibility of *P. insidiosum* to combinations of the antifungal drugs terbinafine or itraconazole with *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils.

Methods: *In vitro* combinations of antifungal drugs with essential oils were evaluated using the checkerboard microdilution method against 20 Brazilian isolates of *P. insidiosum*. The tests were performed according to the protocol M38-A2 and the combinations' interpretation was based on the values of fractional inhibitory concentration index (FICI).

Results: The combinations of itraconazole with essential oils showed prominent synergistic effect on *P. insidiosum* isolates, and no antagonism was observed with these combinations. On the other hand, the combinations of terbinafine with essential oils resulted in indifferent or antagonistic effect.

Conclusions: The combination of bioactive compounds derived from plants with antifungal drugs may be an alternative therapy to be applied in the control of infections caused by *P. insidiosum*. Studies of new therapeutic protocols involving these proposal combinations are needed.

Keywords: Pythiosis • azoles • *Melaleuca alternifolia* • *Mentha piperita* • *Origanum vulgare*

Introdução

Os oomicetos são um grupo de organismos eucariotos que habitam ecossistemas de água doce e ambientes terrestres. Embora compartilhem muitas características com os fungos, incluindo a estrutura somática formada por hifas e a produção de esporos, são micro-organismos *fungal-like*.¹ A ausência de ergosterol na membrana citoplasmática os torna intrinsecamente resistentes à maioria dos antifúngicos convencionais². Enquanto alguns gêneros de oomicetos são sapróbios, outros são patógenos, podendo causar graves infecções em plantas (*Pythium* e *Phytophthora*), insetos (*Lagenidium* e *Pythium*), peixes (*Achlya*, *Saprolegnia* e *Pythium*) e mamíferos (*Lagenidium* e *Pythium*).³ Nestes últimos, *Pythium insidiosum* é a espécie patogêna de maior relevância, determinando a pitiose, uma doença emergente, de rápida evolução, difícil tratamento e que oferece risco de vida.²

A pitiose tem sido relatada em equinos, caninos, homens e outras espécies que habitam ambientes pantanosos de áreas tropicais e subtropicais, com a maioria dos casos ocorrendo nas Américas, Ásia e Austrália.³ Embora, nos últimos anos, os estudos envolvendo métodos de diagnóstico e protocolos terapêuticos para o tratamento da enfermidade tenham avançado significativamente, a pitiose permanece sendo uma infecção difícil de tratar. Parte dos insucessos terapêuticos deve-se a deficiente resposta de *P. insidiosum* às terapias antifúngicas.⁴

Neste sentido, o desenvolvimento de novos agentes antifúngicos, com diferentes mecanismos de ação e o possível efeito sinérgico obtido com a combinação de agentes antifúngicos com fármacos de outras classes farmacêuticas, têm estimulado as pesquisas que empregam a combinação de agentes antimicrobianos.⁵ Embora *P. insidiosum* não contenha ergosterol em sua membrana citoplasmática, estudos clínicos relataram o sucesso terapêutico quando itraconazol e terbinafina foram utilizados em combinação e/ou associação com outros métodos terapêuticos.⁶⁻¹⁰ Adicionalmente, estudos demonstram que a associação de diferentes fármacos apresentam efeitos sinérgicos sobre *P. insidiosum*.^{4,5, 10-14}

A composição química dos óleos essenciais de plantas medicinais possui comprovada propriedade antibacteriana,¹⁵ antifúngica,^{16,17} antiparasitária¹⁸ e repelente de insetos.¹⁹ Adicionalmente, estudos prévios relataram a suscetibilidade do gênero *Pythium* a óleos essenciais e extratos outros de plantas,¹⁹⁻²² incluindo *P. insidiosum*.^{13,14,23-25} Todavia, estudos envolvendo *P. insidiosum* empregando a combinação de óleos essenciais de plantas entre si e/ou com outras classes de fármacos antimicrobianos são incipientes. Apenas Jesus *et al.*¹³ evidenciaram efeitos sinérgicos da combinação de carvacrol e timol com agentes antimicrobianos sobre este oomiceto e Fonseca *et al.*¹⁴ observaram *in vivo* o sinergismo da associação do óleo essencial de *Origanum vulgare* e *Mentha piperita* ao tratar coelhos com pitiose experimental.

O presente estudo objetivou investigar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente às combinações dos fármacos antifúngicos, terbinafina ou itraconazol, com os óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare*.

Material e Métodos

Isolados e preparo do inóculo de *P. insidiosum*

Dezenove isolados brasileiros de *P. insidiosum* obtidos a partir de *kunkers* de equinos com pitiose e uma cepa padrão (CBS 101555) foram incluídos neste estudo. Todos os isolados foram caracterizados por suas características morfológicas, PCR e sequenciamento de DNA, conforme descrito anteriormente²⁶. O inóculo para os testes de suscetibilidade empregou cultura micelial de *P. insidiosum*, elaborado conforme descrito,²⁷ diluído 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS (ácido morfolínico propanosulfônico).

Antifúngicos e Óleos essenciais empregados no estudo

Os compostos avaliados no presente estudo incluíram os antifúngicos itraconazol (ITR, 256 – 0,5 µg/mL) e terbinafina (TER, 128 – 0,25µg/mL) (ASKY, Ltda, São Bernardo do Campo-SP, Brasil)

Óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (MA, 4.250 - 30µg/mL na terapia isolada e 14.000-25µg/mL na combinação) (Laszlo Aromaterapia Ltda, Belo Horizonte, Brasil), *Mentha piperita* (MP, 14.000 - 25 µg/mL) e *Origanum vulgare* (OV, 14.000 - 25µg/mL) (Ferquima Indústria e Comércio Ltda, São Paulo-SP, Brasil). Os componentes dos óleos essenciais foram fornecidos pelo fabricante e os seus componentes majoritários consistiram de: *M. alternifolia*: terpineno-4-ol (40 – 52 %), γ-terpineno (6 – 20 %), α-terpineno (11 – 16 %), 1.8 cineol (1 – 2 %), terpineol (5 %), limoneno (3 – 4 %), pineno (3 – 5 %), terpinoleno (1 – 5 %); *M. piperita*: 1-mentol (33%), mentona (30%), acetato de mentila (4%), eucaliptol (6%) e *O. vulgare*: carvacrol (71%), timol (3%), γ -terpineno (4,5%), para-cimeno (3,5%) e β-carfiofileno (4%). As soluções estoque dos óleos essenciais empregadas nos testes foram preparados de acordo com Fonseca et al.²⁴

Testes de suscetibilidade *in vitro*

Os testes de suscetibilidade foram realizados seguindo o protocolo de microdiluição em caldo (M38-A2) do CLSI.²⁸

As combinações de ITR+MA, ITR+MP e ITR+OV, bem como as combinações de TER+MA, TER+MP e TER+OV foram avaliadas empregando o método de *cherkerboard* para microdiluição.^{13,28} Para todos os testes foi utilizado controle positivo (inóculo + RPMI) e negativo (extrato de óleo + antifúngico + RPMI). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40 rpm, durante 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata. A leitura foi macroscópica e levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração em que não houve o crescimento de hifas. As combinações foram interpretadas de acordo com o Índice de Fração Inibitória Mínima (FICI), sendo classificadas como sinérgica ($FICI \leq 0,5$), indiferente ($0,5 < FICI \leq 4$) ou antagonista ($FICI > 4$) [29], utilizando a fórmula $FICI = (CIM\ A\ na\ combinação / CIM\ A\ isolado) + (CIM\ B\ na\ combinação / CIM\ B\ isolado)$, onde CIM A e CIM B indicam a CIM de cada antifúngico e cada óleo essencial avaliado, respectivamente.

Resultados

A suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos antifúngicos e óleos essenciais individuais estão demonstrados na Tabela 1. Evidenciou-se a melhor atividade antimicrobiana da terbinafina com concentrações inibitórias mínimas que variaram entre 4 e 16µg/mL e CIM₅₀ e CIM₉₀ de 8µg/mL e 16µg/mL, respectivamente. Observou-se que *O. vulgare* apresentou os menores valores de CIM (50 -1750µg/mL) com CIM₅₀ e CIM₉₀ de 220 e 870µg/mL, respectivamente.

Os resultados das combinações estão demonstrados na Tabela 2. As combinações de itraconazol com os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* evidenciaram, respectivamente, sinergismo para 95% (19/20), 80% (16/20) e 60% (12/20) dos isolados de *P. insidiosum* avaliados. Nenhuma das combinações de itraconazol com os óleos essenciais apresentou efeito antagônico. Quando avaliada as combinações de terbinafina com os óleos essenciais, verificou-se que o efeito sinérgico não ocorreu em nenhuma das combinações. No

entanto, indiferença foi observada em 100% (20/20), 90% (18/20) e 85% (17/20) das combinações de terbinafina com *M. alternifolia*, *M. piperita*, e *O. vulgare*, respectivamente. Efeito antagônico foi evidenciado nas combinações com *M. piperita* (10%, 2/20) e *O. vulgare* (15%, 3/20). No geral, notou-se que as CIM nas combinações apresentaram menores valores que as CIM isoladas, sendo este efeito evidenciado no itraconazol.

Discussão

A busca por novos tratamentos para a pitiose que sejam eficazes é fundamental. Por se tratar de uma doença comumente fatal que acomete especialmente equinos e humanos que habitam áreas pantanosas em regiões tropicais e subtropicais.^{30,31} e ter por agente etiológico *P. insidiosum*, o qual é um oomiceto, *fungus-like*, que possui como características ausência do ergosterol na composição de membrana citoplasmática e parede composta por traços de celulose, explica, em parte, a ineficácia dos tratamentos convencionais da terapia antifúngica.³ Dessa forma, é fundamental a busca por novos tratamentos que sejam eficazes no combate a essa importante enfermidade.

Os resultados obtidos no presente estudo quanto à suscetibilidade de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *O. vulgare* e *M. piperita* foram similares aos relatados por Fonseca et al.¹⁴ No que se refere ao óleo essencial de *M. alternifolia* o nosso grupo de pesquisa tem avaliado a suscetibilidade *in vitro* deste oomiceto com resultados similares aos observados neste estudo (dados não publicados).

As CIM encontradas no presente trabalho para os fármacos antifúngicos itraconazol e terbinafina frente a *P. insidiosum* foram condizentes com os resultados prévios de outros autores.^{5,11,12,27,32}

Este é o primeiro relato do perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros do oomiceto *P. insidiosum* frente às combinações dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M.*

piperita e *O. vulgare* com os antifúngicos azólicos, itraconazol ou terbinafina. Interessantemente, observou-se que as combinações dos óleos essenciais avaliados com o ITR não apresentaram antagonismo e resultaram, em sua maioria, em efeito sinérgico. Ressalta-se a interação verificada entre ITR e *M. alternifolia* com 95% de sinergismo. Adicionalmente, observou-se que as CIM isoladas do ITR foram reduzidas em todas as combinações frente a todos os isolados de *P. insidiosum*. Por outro lado, as combinações dos óleos essenciais com TER demonstraram indiferença para a maioria dos isolados avaliados. Em nosso trabalho, os resultados da combinação do ITR com *M. alternifolia* foram comparáveis aos de JESUS *et al.*¹³ que combinaram os compostos bioativos carvacrol ou timol, com fármacos antimicrobianos, incluindo itraconazol e terbinafina. Estes autores obtiveram 96% de sinergismo nas combinações entre itraconazol com o carvacrol e com o timol. No entanto, nossos resultados com a combinação da TER com óleos essenciais diferiram dos relatados por JESUS *et al.*,¹³ uma vez que obtiveram 48% e 32% de efeito sinérgico nas combinações de terbinafina com timol ou carvacrol, respectivamente. Sugere-se que estas diferenças encontradas podem ser atribuídas aos diferentes compostos bioativos presentes nas substâncias empregadas nestes estudos. Cavaleiro *et al.*⁵ ao associar terbinafina com fármacos não antifúngicos, incluindo metronidazol, rifampicina e fluvastatina obtiveram resultados desapontadores, observando altos índices de indiferença ou antagonismo, similares aos nossos resultados.

O sinergismo $\geq 60\%$ do ITR observado no presente estudo, bem como a indiferença $\geq 85\%$ da TER podem ser comparáveis aos efeitos relatados por outros estudos *in vitro* que empregaram combinações destes antifúngicos com outros fármacos de distintos mecanismos de ação antimicrobiana frente a *P. insidiosum*.^{5,11,32,32}

Os antifúngicos azólicos atuam comprometendo a biossíntese do ergosterol, componente da membrana citoplasmática dos fungos. O itraconazol atua interferindo na inibição da

enzima 14 α -esterol desmetilase dependente do citocromo P-450, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol.³⁴ Todavia, a terbinafina atua em uma etapa precursora à biossíntese do ergosterol, agindo na enzima esqualeno-epoxidase, determinando deficiência de ergosterol na membrana e acúmulo intracelular de esqualeno o qual é tóxico à célula.³⁵ Embora *P. insidiosum* não apresente ergosterol em sua membrana citoplasmática, outras vias de biossíntese de esteróis em outros oomicetos têm sido relatadas.^{1,36} Em Pythiaceae, a via de biossíntese de esteróis não está completamente ausente e os compostos formados a partir dos precursores de esteróis, assim como tetraimanol e carotenol, parecem substituir a função dos esteróis na membrana citoplasmática.³⁶ Este fato pode estar relacionado com os resultados que demonstram a suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *P. insidiosum* relatados em alguns estudos empregando os antifúngicos azólicos.^{5-9,11,32}

A ação antimicrobiana dos óleos essenciais é devido às alterações na integridade da membrana citoplasmática, incluindo interferências sobre o transporte de elétrons e de proteínas, e nos processos de fosforilação imprescindíveis aos mecanismos celulares.^{36,38} Acredita-se que este mecanismo poderia auxiliar a ação dos antifúngicos sobre *P. insidiosum* e, em parte, explicaria os resultados obtidos neste estudo. Adicionalmente, segundo Zhu *et al.*³⁹ a associação de dois compostos pode aumentar a taxa de morte microbiana e encurtar a duração do tratamento, bem como permitir o uso de doses mais baixas de cada composto, reduzindo os efeitos tóxicos dos mesmos.

Compilando nossos resultados com as informações derivadas dos diversos estudos empregando as combinações entre diferentes compostos, inferimos que estas opções de terapias podem ser benéficas para o controle da infecção por *P. insidiosum*.

Conclusão

As combinações entre os óleos de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *Origanum vulgare* com itraconazol apresentaram atividade antimicrobiana com efeitos sinérgicos, permitindo sugerir que essa combinação entre compostos bioativos oriundos de plantas com fármacos antifúngicos podem constituir uma alternativa terapêutica a ser aplicada no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. No entanto, outras pesquisas são imprescindíveis na busca de novos protocolos terapêuticos envolvendo tais combinações.

Referências

1. Gaulin E, Bottin A, Dumas B. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. *Plant Signaling & Behavior* 2010;5: 258-60.
2. Gaastra W, Lipman LJA, De Cock AWAM et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol* 2010; **146**:1–16.
3. Mendoza L, Vilela R. The Mammalian Pathogenic Oomycetes. *Clinical Lab Issue* 2013;7:198-208.
4. Zanette RA, Jesus FPK, Pilotto MB et al. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med* 2015; **25**:91-4.
5. Cavalheiro AS, Zanette AR, Spader TB et al. *In vitro* activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol* 2009; **137**: 408–11.
6. Shenep JL, English BK, Kaufman L et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. *Clin Infect Dis*.1998;**27**: 1388-93.
7. Pereira DIB, Botton SA, Azevedo MI et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. *Mycopathologia* 2013;**176**:309–15.

8. Hummel J, Grooters A, Davidson G *et al.* Successful management of gastrointestinal pythiosis in a dog using itraconazole, terbinafine and mefenoxam. *Med Micol* 2011;**49**:539-42.
9. Sudjaritruk T, Sirisanthana V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. *BMC Infect Dis* 2011;**11**:33.
10. Rakich PM, Grooters AM, Tang KN. Gastrointestinal pythiosis in two cats. *J Vet Diagn Invest* 2005;**17**:262-9.
11. Argenta JS, Alves SH, Silveira F *et al.* *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. *Vet Microbiol.* 2012;**157**:137-42.
12. Jesus FP, Loreto ÉS, Ferreira L *et al.* *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2015;**60**:87-91.
13. Jesus FP, Ferreira L, Bizzi KS *et al.* *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med* 2015;**25**:89-93.
14. Fonseca AO, Pereira DI, Botton SA *et al.* Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Vet Microbiol* 2015;**178**:265-9.
15. Sagave L, Gressler LT, Flores FC *et al.* Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2015;**67**:221-226.
16. Cleff MB, Meinerz AR, Faria RO *et al.* Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2010; **62**:1291-4.
17. Cleff MB, Meinerz AR, Xavier M *et al.* *In vitro* susceptibility of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. *Braz J Microbiol* 2010;**41**:116-23.

18. Santos TG, Rebelo RA, Dalmarco EM *et al.* Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC. *Quim Nova* 2012;**35**:477-81.
19. Lee SO, Choi GJC, Jang KS *et al.* Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *The Plant Pathology Journal* 2007;**23**:97-102.
20. Zambonelli A, D'aulerio AZ, Bianchi A *et al.* Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. *J Phytopathol* 1996;**144**:491-494.
21. Bruni R, Medici A, Andreotti E *et al.* Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chem* 2004;**85**:415–421.
22. Wogiatzi E, Gougoulas N, Papachatzis A *et al.* Chemical composition and antimicrobial effects of grek *Origanum* species essential oil. *Biotechnol & Biotech Eq* 2009;**23**:1322-24.
23. Suthiwong J, Sriphana U, Thongsri Y *et al.* Coumarinoid from the fruits of *Micromelum facatum*. *Fitoterapia* 2014;**94**:134–141.
24. Fonseca AOS, Pereira DIB, Jacob RG *et al.* *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some *Lamiaceae* family species. *Mycopathologia* 2015; **179**: 253-8.
25. Sriphana U, Thongsri Y, Ardwichai P *et al.* New lignin esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. *Fitoterapia* 2013;**91**:39-43.
26. Azevedo MI, Pereira DIB, Botton AS *et al.* *Pythium insidiosum*: Morphological and molecular identification of Brazilian isolates. *Pesq Vet Bras* 2012; **32**:619-622.
27. Fonseca AOS, Pereira DIB, Maia Filho FS *et al.* *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. *J Antimicrob Chemth* 2014;**69**:1564-67.

28. 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.
29. Johnson MD, McDougall C, Ostrosky-Zeichner L *et al.* Combination antifungal therapy. *Antimicrob Agents Chemoter.* 2004;**48**:693-15.
30. Santurio JM, Alves SH, Pereira DB *et al.* Pitiose: uma micose emergente. *Acta Scientiae Veterinarie.* 2006; **34**: 1-14.
31. Krajaejun T; Sathapatayavongs B; Prachartam R *et al.* Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. *Clin Infect Dis* 2006; **43**: 569-76.
32. Argenta JS, Santurio JM, Alves SH *et al.* *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combiantion, against Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. *Antimicrob Agents Ch* 2008;**52**: 767-69.
33. Cavaleiro AS, Maboni G, Azevedo MI *et al.* *In vitro* activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; **53**: 2136-38.
34. Ghannoum MA, Rice LB. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev* 1999;**12**:501-17.
35. Costa EO, Gorniak SL .Agentes antifúngicos e antivirais. In: Spinoso HS, Gorniak SL Bernardi M. M. eds. *Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002;431-442.
36. Griffith, JM, Davis AJ, Grant BR . Target sites of fungicides to control Oomycetes, p.69-99. In W. Koeller ed. *Target sites of fungicide action*. CRC, Boca Raton, FL, 1992;328.
37. Dorman HJD, Deans SG. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J Appl Microbiol* 2000;**88**:308-16.

38. Rao A, Zang V, Muend S *et al.* Mechanism of antifungal activity of terpenoid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. *Antimicrob Agents Chemoter* 2010;**54**:5062-69.
39. Zhu L, Gil-Lamaignere C, Müller FC. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. *Mycoses* 2004; **47**:319-25.

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* (n=20) aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* e aos fármacos antifúngicos itraconazol e terbinafina.

Agente antimicrobiano	Faixa de CIM ¹	CIM ₅₀ ²	CIM ₉₀ ³
<i>M. alternifolia</i>	531-2125	1062,5	2125
<i>M. piperita</i>	110-1750	445	3500
<i>O. vulgare</i>	50-1750	220	870
Itraconazol	>64	64	128
Terbinafina	4-16	8	16

¹Concentração inibitória mínima; ²Concentração inibitória mínima que inibiu 50% dos isolados; ³Concentração inibitória mínima que inibiu 90% dos isolados.

Tabela2: Perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* (MA), *Mentha piperita* (MP) e *Origanum vulgare* (OV) com os fármacos antifúngicos itraconazol (ITR) ou terbinafina (TER)

Isolado	¹ CIM das combinações																	
	ITR/ MP	² FICI	³ In	ITR/ OV	FICI	In	ITR/ MA	FICI	In	TER/ MP	FICI	In	TER/ OV	FICI	In	TER/ MA	FICI	In
001	8/109,37	0,3	S	4/109,37	1	I	16/109,37	0,22	S	2/218,75	0,74	I	8/109,37	1,99	I	8/875	1,82	I
002	8/109,37	0,6	I	8/109,37	1,1	I	16/109,37	0,35	S	2/437,5	2,48	I	2/218,75	2,48	I	2/1750	2,14	I
004	8/109,37	0,5	S	4/109,37	2	I	16/109,37	0,33	S	4/218,75	1,24	I	8/109,37	2,68	I	8/218,75	0,9	I
008	8/109,37	1	I	4/109,37	2,25	I	16/109,37	0,45	S	4/218,75	2,98	I	8/109,37	4,18	A	2/1750	3,7	I
009	8/109,37	0,4	S	8/109,37	2,31	I	16/218,75	0,45	S	2/1750	4,43	A	8/109,37	4,18	A	8/875	2,82	I
011	16/109,37	0,7	I	4/109,37	0,5	S	16/109,37	0,45	S	16/109,37	2,49	I	8/109,37	1,49	I	2/1750	3,5	I
014	4/109,37	0,5	S	4/109,37	0,52	S	8/218,75	0,16	S	4/109,37	0,99	I	4/218,75	1,49	I	2/1750	1,07	I
016	8/109,37	0,6	I	8/109,37	2,3	I	16/109,37	0,3	S	16/109,37	4,49	A	8/109,37	4,18	A	4/3500	2,64	I
018	8/109,37	0,3	S	4/109,37	1	I	16/109,37	0,17	S	4/109,37	0,74	I	8/109,37	1,99	I	2/1750	1,07	I
021	8/109,37	0,4	S	8/218,75	0,25	S	16/109,37	0,35	S	16/109,37	1,24	I	8/109,37	0,56	I	8/875	1,32	I
025	4/109,37	0,09	S	16/109,37	0,37	S	16/109,37	0,35	S	2/1750	0,75	I	2/437,5	0,75	I	2/3500	3,5	I
026	4/109,37	0,5	S	8/109,37	0,6	I	16/109,37	0,3	S	4/109,37	1,49	I	2/437,5	2,48	I	2/3500	2,14	I
028	16/109,37	0,15	S	16/109,37	0,25	S	32/218,75	0,45	S	8/437,75	0,62	I	8/109,37	0,6	I	2/875	0,94	I
031	16/109,37	0,3	S	8/109,37	0,18	S	16/109,37	0,35	S	4/437,5	0,75	I	4/437,5	1	I	2/1750	1,89	I
032	8/109,37	0,15	S	16/109,37	0,37	S	32/109,37	0,5	S	2/1750	0,75	I	4/437,5	1,5	I	2/3500	2,14	I
033	16/109,37	0,15	S	16/109,37	0,25	S	16/109,37	0,22	S	2/1750	1	I	8/109,37	2,12	I	2/3500	3,79	I
034	8/109,37	0,18	S	16/109,37	0,37	S	32/109,37	0,6	I	2/875	0,75	I	8/109,37	1,12	I	2/1750	1,89	I
035	8/109,37	0,15	S	16/218,75	0,5	S	16/109,37	0,3	S	2/1750	1	I	2/875	1,5	I	2/3500	2,14	I
036	8/109,37	0,15	S	8/109,37	0,25	S	16/109,37	0,35	S	2/1750	0,75	I	8/109,37	1,12	I	2/3500	3,5	I
CBS	8/109,37	0,25	S	16/109,37	0,37	S	16/109,37	0,35	S	16/109,37	1,12	I	8/109,37	0,6	I	2/875	0,94	I

¹CIM, concentração inibitória mínima; ²FICI, índice de concentração inibitória fracional; ³In, interpretação; ⁴S, sinergismo; ⁵I, indiferença; ⁶A, antagonismo.

Discussão geral

A pitiose é uma doença comumente fatal que acomete especialmente equinos e humanos que habitam áreas pantanosas em regiões tropicais e subtropicais e requer atenção, uma vez que há limitações nas opções terapêuticas (KRAJAEJUN et al., 2006; SANTURIO et al., 2006).

O fato desse patógeno apresentar ausência do ergosterol na composição de membrana citoplasmática justifica o fracasso nos tratamentos empregado os fármacos convencionais de terapia antifúngica (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). Diante das dificuldades em opções terapêuticas eficazes para o tratamento da pitiose, muitas investigações buscam terapias alternativas e adicionais. Dentre essas investigações, são relevantes as pesquisas *in vitro* e *in vivo* que vêm avaliando a ação antimicrobiana de compostos bioativos e óleos essenciais de plantas (JESUS et al., 2014b; FONSECA et al., 2015a,b), bem como de compostos extraídos de raiz (SHRIPHANA et al., 2013ab) e de frutos de plantas (SUTHIWONG et al. 2014).

O presente estudo teve como objetivo avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* isolados, combinados entre si e em suas combinações com os antifúngicos itraconazol ou terbinafina.

Os resultados obtidos demonstraram que os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* quando avaliados isoladamente, apresentaram atividade anti-*Pythium insidiosum*. Estudos prévios realizados por Fonseca (2011) e Fonseca et al. (2015a) relataram a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare* evidenciando a melhor atividade do orégano, o que também foi evidenciado no presente estudo. Por outro lado, pesquisas avaliando a ação de *M. alternifolia* sobre *Pythium insidiosum* não são relatadas. Desta forma, nosso estudo, é o primeiro a avaliar a ação dessa planta sobre este oomiceto. Demonstrou-

se que *M. alternifolia* nas formulações de óleo livre e em nanoemulsão apresentaram atividade antimicrobiana frente a *P. insidiosum*. Verificou-se que na formulação de nanoemulsão, *M. alternifolia* foi superior em atividade antimicrobiana em relação ao óleo livre. A atividade antimicrobiana desta planta tem sido amplamente estudada contra diferentes micro-organismos, entre eles: fungos verdadeiros (FLORES et al., 2013; GROOTERS, 2003), bactérias (CARSON; RILEY, 2002; SAGAVE et al., 2015), vírus (MINAMI et al., 2003), bem como parasitos (BALDISSERA et al., 2014).

O potencial antimicrobiano de *M. alternifolia* tem sido atribuído aos seus componentes majoritários (terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α terpineol, terpinoleno e α - e γ -terpineno) representando cerca de 90% da estrutura do óleo de *M. alternifolia* (BROPHY et al., 1989). Esta composição também estava presente nas formulações do óleo utilizado neste estudo. A melhor atividade de *M. alternifolia* na formulação de nanoemulsão pode ser explicada pela instabilidade do óleo essencial desta planta em função de seus componentes voláteis, tais como: álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros presentes nas folhas, flores, caule, raiz e sementes da planta (BAKKALI et al., 2008). Dessa forma, as nanoestruturas apresentam maior eficiência por manter a estabilidade do produto final, pois são capazes de proteger o fármaco das dissociações enzimáticas de origem química ou imunológica (BARRAT, 2000).

A combinação entre antimicrobianos vem ganhando destaque nos últimos anos no tratamento da pitiose. Esse estudo foi pioneiro na avaliação *in vitro* de combinações de óleos essenciais frente a *P. insidiosum* e demonstrou que tanto a combinação dos óleos essenciais entre si, como a combinação com o azólico itraconazol podem vir a se constituir numa terapia alternativa/adicional para o tratamento da pitiose.

Neste trabalho, todos os óleos essenciais avaliados apresentaram atividade anti-*P. insidiosum*. Embora Fonseca et al. (2015b) não tenham avaliado a combinação *in vitro* de *M. piperita* e *O. vulgare*, os autores demonstraram efeito sinérgico *in vivo* ao tratar coelhos com pitiose experimental. Interessantemente, os maiores índices de sinergismo foram obtidos na combinação entre esses óleos (65%), o que evidencia a correlação do estudo *in vitro* e *in vivo*. Jesus et al. (2015b) avaliaram as combinações de carvacrol ou timol com fármacos antibacterianos e antifúngicos, porém não testaram as combinações dos compostos bioativos entre si. Na presente pesquisa, as combinações de óleos essenciais avaliadas evidenciaram efeito sinérgico para todas as combinações, não havendo nenhum efeito antagônico. Os efeitos sinérgicos das

combinações dos óleos testados são comparáveis aos resultados obtidos por outros estudos *in vitro* que empregaram a combinação de fármacos com distintos mecanismos de ação antimicrobiana frente a *P. insidiosum* (CAVALHEIRO et al., 2009ab; ARGENTA et al., 2012; JESUS et al. 2015a; ZANETTE et al., 2015).

Embora os métodos de diagnóstico e protocolos terapêuticos para o tratamento da pitiose tenham avançado significativamente nos últimos anos, a enfermidade é difícil de tratar e permanece um desafio para os pesquisadores e clínicos. Parte dos insucessos terapêuticos deve-se a deficiente resposta de *P. insidiosum* às terapias antifúngicas (ZANETTE et al., 2015). Neste sentido, o desenvolvimento de novas terapias, que incluem as combinações entre agentes antifúngicos e com fármacos de diferentes mecanismos de ação, têm estimulado as pesquisas que empregam a combinação de agentes antimicrobianos (CAVALHEIRO et al., 2009ab). Embora *P. insidiosum* não contenha ergosterol em sua membrana citoplasmática, alguns estudos clínicos relataram o sucesso terapêutico quando itraconazol e terbinafina foram utilizados em combinação e/ou associação com outros métodos terapêuticos (SHENEP et al., 1998, PEREIRA et al, 2013; HUMMEL et al., 2011; SUDJARITRUK; SIRISANTHANA, 2011; RAKICH; GROOTERS; TANG, 2005). Adicionalmente, estudos demonstram que a associação de diferentes fármacos têm apresentado efeitos sinérgicos sobre *P. insidiosum* (ARGENTA et al., 2012; CAVALHEIRO et al., 2009ab; JESUS et al., 2015a,b; ZANETE et al, 2015; FONSECA et al., 2015b).

No presente estudo, observou-se que as combinações dos óleos essenciais avaliados com o itraconazol não apresentaram antagonismo e resultaram, em sua maioria, em efeito sinérgico (acima de 60%). Ressalta-se a interação verificada entre itraconazol e *M. alternifolia*, com 95% de sinergismo. Por outro lado, as combinações dos óleos essenciais com terbinafina demonstraram indiferença para a maioria dos isolados avaliados a qual pode ser justificada pela menor interação entre os componentes dos óleos essenciais e esse fármaco. Nossos resultados são similares aos relatados por Jesus et al. (2015b) que combinaram os compostos bioativos carvacrol ou timol, com fármacos antimicrobianos, incluindo itraconazol e terbinafina. Estes autores obtiveram 96% de sinergismo nas combinações entre itraconazol com o carvacrol e com o timol. Por outro lado, os resultados da combinação da terbinafina com os óleos essenciais diferiram, parcialmente, dos obtidos por Jesus et al. (2015b) que encontraram 48% e 32% de efeito sinérgico nas combinações de terbinafina com timol ou carvacrol, respectivamente. Sugere-se que estas diferenças

encontradas podem ser atribuídas aos diferentes compostos bioativos presentes nas substâncias empregadas nestes estudos. Desta forma, a atividade antimicrobiana de *O. vulgare* é atribuída à presença de compostos majoritários como carvacrol, tymol, 4-terpineol e linalool (SOYLU; SOYLU S; KURT, 2006; HUSSAIN et al., 2011; FONSECA et al., 2015a). No óleo essencial de *M. piperita* os componentes responsáveis pela sua atividade antimicrobiana são o mentol e a mentona (ISCAN et al., 2002; TYAGI; MALIK, 2011; FONSECA et al., 2015a), em *M. alternifolia* a atividade antimicrobiana é atribuída aos compostos terpinen-4-ol, 1,8 cineol, α terpineol, terpinoleno e α - e γ -terpineno (BROPHY et al., 1989).

Previamente, CAVALHEIRO et al. (2009a) ao associar terbinafina com fármacos não antifúngicos relataram resultados desapontadores, observando altos índices de indiferença ou antagonismo, similares aos nossos resultados.

Tanto o sinergismo do itraconazol ($\geq 60\%$), quanto a indiferença da terbinafina ($\geq 85\%$) observados no presente estudo, podem ser comparáveis aos efeitos relatados por outros estudos *in vitro* que empregaram combinações destes antifúngicos com outros fármacos de distintos mecanismos de ação antimicrobiana frente a *P. insidiosum* (CAVALHEIRO et al., 2009ab; ARGENTA et al., 2008, 2012).

Os efeitos antimicrobianos dos óleos essenciais podem ser atribuídos aos seus mecanismos de ação que geralmente atuam sobre a membrana citoplasmática. Estes mecanismos envolvem a lise e a perda da integridade da membrana devido às alterações que determinam a saída de íons (hidrogênio, potássio e cálcio), gerando danos aos processos essenciais à sobrevivência da célula (DORMAN; DEANS, 2000; RAO et al., 2010). Por outro lado, a ação dos antifúngicos azólicos ocorre pelo comprometimento da biossíntese do ergosterol, componente da membrana citoplasmática dos fungos. O itraconazol atua interferindo na inibição da enzima 14α -esterol desmetilase dependente do citocromo P-450, responsável pela conversão do lanosterol em ergosterol (GHANNOUM; RICE, 1999). Todavia, a terbinafina atua em uma etapa precursora à biossíntese do ergosterol, agindo na enzima esqualeno-epoxidase, determinando deficiência de ergosterol na membrana e acúmulo intracelular de esqualeno o qual é tóxico à célula (COSTA; GÓRNIK, 2002).

Embora *P. insidiosum* não apresente ergosterol em sua membrana citoplasmática, outras vias de biossíntese de esteróis em outros oomicetos foram relatadas (GRIFFITH et al., 1992; GAULIN et al., 2010) e pesquisas demonstram a suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *P. insidiosum* frente a antifúngicos azólicos

(SHENEP et al., 1998, ARGENTA et al, 2008, 2012; CAVALHEIRO et al., 2009; HUMMEL et al., 2011; SUDJARITRUK; SIRISANTHANA, 2011; PEREIRA et al., 2013).

Os resultados das combinações observadas neste estudo sugerem que a interação entre os compostos presentes nos óleos essenciais podem contribuir para a melhor penetração de um óleo quando favorecida pela ação dos compostos do outro óleo na membrana citoplasmática do micro-organismo, ou ainda, pela interação de transporte entre os componentes facilitando o acesso dos óleos à membrana citoplasmática do oomiceto. Adicionalmente, acredita-se que o mecanismo de ação dos óleos essenciais poderia auxiliar a ação dos antifúngicos sobre *P. insidiosum* e, em parte, explicaria os resultados obtidos neste estudo.

Somando nossos resultados com as informações derivadas dos diversos estudos empregando as combinações entre diferentes compostos, infere-se que estas opções de terapias podem ser benéficas para o controle da infecção por *P. insidiosum*. No entanto, outras pesquisas são requeridas para determinar novos protocolos terapêuticos envolvendo tais combinações.

8 Conclusões

- As formulações de óleo livre e nanoemulsão de *Melaleuca alternifolia* apresentam atividade antimicrobiana frente ao oomiceto *P. insidiosum*, destacando-se a superior atividade anti-*P. insidiosum* da formulação de nanoemulsão.
- *P. insidiosum* apresenta suscetibilidade *in vitro* aos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare*, bem como as suas combinações. Evidencia-se a melhor atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare* quando avaliado isolamente e do sinergismo observado na combinação deste óleo com *M. piperita*.
- O acentuado efeito sinérgico das combinações dos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* com o azólico itraconazol, sugerem que estas combinações devem ser consideradas como uma terapia aditiva e/ou alternativa para o tratamento da pitiose.
- A combinação entre compostos bioativos oriundos de plantas combinados entre si ou com fármacos antifúngicos podem constituir uma alternativa terapêutica a ser aplicada no controle de infecções causadas por *P. insidiosum*. No entanto, estudos adicionais são imprescindíveis na busca de novos protocolos terapêuticos envolvendo tais combinações.

Referências bibliográficas

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 683-737.

ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* activities of voriconazole, itraconazole and terbinafine, alone or in combination, against Brazilian *Pythium insidiosum* isolates. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.52, n.2, p. 767-769, feb. 2008.

ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin. **Veterinary Microbiology**. v. 145 n.3-4, p.321-323, oct, 2010.

ARGENTA, J.S. et al. *In vitro* and *in vivo* susceptibility of two-drug and three-drug combinations of terbinafine, itraconazole, caspofungin, ibuprofen and fluvastatin against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**. V.157, p.137-142, nov. 2012.

ARSLAN, M.; DEVIS, S. Antifungal activity of essential oils against three vegetative compatibility groups of *Verticillium dahlia*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 26; n.10, p.1813–1821; 2010.

AUSTWICK, P. K.; COPLAND, J.W. Swamp cancer. **Nature**. v.250, n.461, p.84, jul, 1974.

BAKKALIF. et al. Biological effects of essential oils a review. **Food and Chemical Toxicology**. v.46, n.2, p.446-475, dec. 2008.

BALDISSERA M.D. et al. Trypanocidal action of tea tree oil (*Melaleuca alternifolia*) against *Trypanosoma evansi* *in vitro* and *in vivo* used mice as experimental model. **Experimental Parasitology**. v.141, p.21–27, jun. 2014.

BALFOUR, J. A.; FAULDS, D. Terbinafine. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential in superficial mycoses. **Drugs**. v. 43, n.2, p.259-284, 1992.

BARRAT, G. M. Therapeutic applications of colloidal drug carriers. **Pharmaceutic Science Technology Today**, v.3, n.5, p.163-171, 2000.

BENETT, J. E. Antimicrobianos (continuação) - agentes antifúngicos. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 10th. ed, Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2003, p.971-983.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**. v.17, n.3-4, p. 80-83, jan. 2005.

BISSONNETTE K.W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **Journal Medical and Veterinary Mycology**. v.29.n.1.p.39-44, sept.1991.

BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis, Brasil. **Emerging Infectious Diseases**. v. 11,n. 5, p. 715-718, sep. 2005.

BOSSCHE, H.V. Biochemical targets for antifungal azole derivatives hypothesis on the mode of action. **Current Topics in Medical Mycology**. v.1, p.313-351, 1985.

BOSSCHE, H.V; ENGELEN M.; ROCHETTE F. Antifungal agents of use in animal health - chemical, biochemical and pharmacological aspects. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. v.26, n.1, p. 5-29, 2003.

BRIDGES, C. H.; EMMONS C.W. A phycomycosis of horse caused by *Hyphomyces destruens*. *Journal of American Veterinary Medical Association*. v.8, p.579-589, 1961.

BROPHY, J.J. et al. Gaschromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type (Australian tea tree). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 37, n.5, p. 1330-1335, sept. 1989.

BRUNI, R., et al. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower cálices. **Food Chemistry**, v. 85, p. 415–421, may, 2004.

CALVANO, T. P. et al. *Pythium aphanidermatum* Infection following Combat Trauma. **Journal Clinical of Microbiology**. v 49.n.10. p.3710–13, oct. 2011.

CAMPACCI, M. H. et al. Efeito do óleo de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) sobre o crescimento micelial de *Trichoderma* spp. e *Lentinula edodes* “in vitro”. **Arquivos do Instituto Biológico**. v.72, n.1, p.1-63, jan. 2005.

CAMUS, A.C.; GROOTERS, A.M.; AQUILAR, R.F. Granulomatous pneumonia caused by *Pythium insidiosum* in a central American jaguar, *Panthera onca*. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 16, p. 567-571, 2004.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. **Antimicrobial activity of tea tree oil**. Nedlands, Australia: Rural Industries Research and Development Corporation, 1998.

CARSON C., RILEY T.V., COOKSON B.D.- Efficacy and safety of tea tree oil as a topical antimicrobial agent. **Journal Hosp. Infect.** v.40, n.3, p. 175-178, nov. 1998.

CARSON, C. F.; MEE, B.J.; RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v.46, n.6, p.1914-1920, 2002.

CAVALHEIRO, A.S. et al. In vitro activity of terbinafine associated to amphotericin B, fluvastatin, rifampicin, metronidazole and ibuprofen against *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v. 137, p.408-411, jun. 2009 a.

CAVALHEIRO, A.S. et al. In vitro activity of terbinafine combined with caspofungin and azoles against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n.5, p. 2136-2138, may. 2009 b.

CAZEDEY, C.L. et al. Desenvolvimento e validação de metodologia analítica para determinação de itraconazol em produtos farmacêuticos por CLAE. **Química Nova**, v.30, n.4, p.774-776, july/aug. 2007.

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; HOOPER, N. Multicentric cutaneous pythiosis in a foal. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 201, n. 2, p. 310-312, 1992.

CHIFIRIUC C. et al. Hybrid magnetite nanoparticles/*Rosmarinus officinalis* essential oil nanobiosystem with antibiofilm activity. **Nanoscale Research Letters**.v.7, p. 209, apr. 2012.

CLEFF, M.B. et al. *In vitro* susceptibility of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.41, p. 116-123, jan/mar. 2010a.

Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI), 2008. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard, second edition, CLSI Document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898, USA, ISBN: 1-56238-668-9.

CORLIS, J.O. An interim utilitarian ("user friendly") hierarchical classification and characterization of the protista. *Acta Protozoologica*. v.33, p. 1-51, 1994.

COSTA E.O.; GORNIAC S.L. Agentes antifúngicos e antivirais. In: SPINOSA H. S.; GORNIAC S. L. & BERNARDI M. M. **Farmacologia aplicada à Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 431-442.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**. v.88, n.1, p. 170-175, dec. 2000.

CUENCA-ESTRELLA, M. Combinations of antifungal agents in therapy--what value are they? **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.54, n.5, p.854-869, 2004.

DE COCK, A.W. et al. *Pythium insidiosum* sp. nov. the etiologic agent of pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 25, n. 2, p. 344-349, feb.1987.

DO CARMO P.M. et al. Cutaneous pythiosis in a goat. **Journal of Comparative Pathology**, v.152.n.2-3. p.103-5, feb/apr. 2015.

DÓRIA, R.G.S. et al. Treatment of pythiosis in equine limbs using intravenous regional perfusion of anphotericin B. **Veterinary Sugery**. v.41, n.6, p. 759-765, aug. 2012.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal Aplicaded Microbiology**, v.88, n.22, p.308-316, 2000.

DYKSTRA, M.J. et al. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, v. 37, n. 6, p. 427-433, dec. 1999.

ENGLISH, P.B.; FROST, A.J. Phycomycosis in a dog. **Australian Veterinary Journal**. v. 61, n. 9, p. 291-292, 1984.

FLEISHER, A.; FLEISHER Z. Identification of Biblical Hyssop and Origin of the Traditional Use of Oregano-Group Herbs in the Mediterranean Region. **Economic botany**. v.42, n.2, p.232-241, 1988.

FLORES, F. C. et al. Antifungal Activity of Nanocapsule Suspensions Containing Tea Tree Oil on the Growth of *Trichophyton rubrum*. **Mycopathologia**. v.175, n.3, p.281-286, feb. 2013.

FOIL, C.S.O. et al. A report of subcutaneous pythiosis in five dogs and a review of the etiologic agent *Pythium spp*. **Journal of the American Animal Hospital Association**.v. 20, p. 959-966, 1984.

FOIL, C.S.O. Update on Pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**. p. 57-63, 1996.

FONSECA , A.O. **Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e Dermatófitos**. 2011.42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 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. 2014a.

FONSECA et al. *In vitro* reproduction of the life cycle of *Pythium insidiosum* from kunkers' equine and their role in the epidemiology of pythiosis. *Mycopathologia*. v. 177, n.1-2, p.123-127, feb. 2014b.

FONSECA et al. *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of some Lamiaceae family species. **Micopathologia**. v.179, n.3-4, p.253-258, apr. 2015 a.

FONSECA et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Veterinary Microbiology*. v.178, n.3-4, p.265-269, aug.2015b.

GAASTRA, W. et al. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, n. (1-2), p. 1-16, jul. 2010.

GAULIN E, BOTTIN A, DUMAS B. Sterol biosynthesis in oomycete pathogens. **Plant Signaling & Behavior**, v.5, n.3, p. 258-260, mar. 2010.

GEORGOPAPADAKOU, N.H.; WALSH, T.J. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**. v. 40, n.2, p. 279–291, 1996.

GHANNOUM, M. A.; RICE L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v.12, n.4, p. 501-517, 1999.

GOBERT, V. et al. Hybridization in the section *Mentha*(Lamiaceae) inferred from AFLP markers. **American Journal of Botany**. v.89, n.12, p.2017-2023, dec. 2002.

GONZÁLES, H.E. et al. Tratamiento de la ficomicosis equina subcutanea empleando yoduro de potasio. **Revista ICA**. v. 14, n. 2, p. 115-122, jun. 1979.

GRECCO, F.B. et al. Pitiose cutânea em bovinos na região Sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 29, n.11, 938-942, nov. 2009.

GRIFFITH, J.M.; DAVIS, A.J.; GRANT B.R. Target sites of fungicides to control Oomycetes, p.69-99. In Koeller, W. Target sites of fungicide action. CRC, Boca Raton, FL., 1992. 328p.

GROOTERS, A.M.; GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **Journal of Veterinary Internal Medicine**. v. 16, n. 2, p. 147-152, 2002.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Veterinary Clinics Small Animal Practice**. v. 33, p. 695-720, 2003.

GUTERRES, S. S.; ALVES M. P.; POHLMANN, A. R. Polymeric nanoparticles, nanospheres and nanocapsules. **Drug Target Insights**, v.2, n.1, p.147-157, 2007.

HALCON L.; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: A review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 7, p. 402-408, 2004.

HAMMER KA, CARSON CF, RILEY TV. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil against dermatophytes and other filamentous fungi. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**. v.50, n.2, p.195-199, aug. 2002.

HENDRIX, J.W. Sterols in growth and reproduction of fungi. **Annual Review Phytopathology**. v. 8, p. 111-130, 1970.

HUMMEL, J. et al. Successful management of gastrointestinal pythiosis in a dog using itraconazole, terbinafine and mefenoxam. **Medical Mycology**. v.49, n.5, p.539-42, jul. 2011.

HUSSAIN AI et al. Composition, antioxidant and chemotherapeutic properties of the essential oils from two *Origanum* species growing in Pakistan. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.21, n.6, p.943-52, sept. 2011.

ICHITANI, T.; AMEMIYA, J. *Pythium gracile* isolated from the foci of granular dermatitis in the horse (*Equus caballus*). **Transactions of Mycological Society Japan**. v. 21, p. 263-265, 1980.

IMWIDTHAYA, P. Human pythiosis in Thailand. Postgraduate **Medical Journal**.v.70, p.70, p.558-560, 1994.

ISCAN G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.50, n.14, p.3943-6, jul. 2002.

JAEGER, G.H.; ROTSTEIN, D.S.; LAW, J.M. Prostatic pythiosis in a dog. **Journal Veterinary Internal Medicine**. v. 16, p. 598-602, 2002.

JESUS F.P. et al. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents of Chemotherapy**. v.60, n.1, p.87-91, oct. 2015a.

JESUS F.P. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**. v.25, n.2, p. 89-93, jun. 2015b.

JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.3, p.693-715, marc.2004.

KAGEYAMA, K. Molecular taxonomy and its application to ecological studies of *Pythium* species. **Journal of General Plant Pathology**, v.80, n.4, p.314-326, 2014.

KAČÁNIOVÁ, M. et al. Antibacterial activity against *Clostridium* genus and antiradical activity of the essential oils from different origin. **Journal of Environmental Science and Health**. v. 49,n.7, p. 505-512, may.2014.

KAUL, V. K.; SINGH, B.; SOOD, R. P. Essential oil of *Origanum vulgare* L. from north India. **Journal of Essential Oil Research**. v. 8, n.1, p.101-103, 1996.

KEOPRASOM, N. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient presenting as bilateral leg ulcers. **Medical Mycology Case Reports**. v.8, n.2, p.25-8, dec. 2012.

KOKKINI, S.; R. KAROUSOU ; VOKOU D. Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. **Biochemical Systematics and Ecology**.v. 22, n.5, p.517-528, 1994.

KRAJAEJUN, T. et al. Clinical and epidemiological analyses of human pythiosis in Thailand. **Clinical Infectious Disease**. v. 43, p. 569-576, sept. 2006.

KWON-CHUNG, K.J. Phylogenetic spectron of fungi that are pathogenic to humans. **Clinical Infections Diseases**. v. 19, n.1, p. 1-7, 1994.

LAOHAPENSANG, K. et al. Vascular pythiosis in a thalassemic patient. **Vascular** v.17,p. 234-238,jun. 2009.

LEAL, A. T. et al.; Pitose- Revisão Bibliográfica. **Ciência Rural**, v.31, n.4, p. 735-743, jul. 2001.

LEE, S.O. et al. 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, nov. 2007.

LEUNG, A.Y.; FOSTER, S. **Encyclopedia of common natural ingredients used in foods, drugs and cosmetics**. 2^a ed. New York: Wiley, 1996, 466p.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. Família Lamiaceae: Importantes Óleos Essenciais com Ação Biológica e Antioxidante. *Revista Fitos*. v.3, n.3, p.1-11, 2007.

LOREN ZETTI, E. R. Bioatividade de óleos essenciais no controle de *Botrytis cinerea* isolado de morango. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**. v. 13, n. 1, p. 619-627, agosto. 2011.

LORETO E. S. et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy** v.55, n.7, p.3588-3590, jul. 2011.

LORETO E.S. et al. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**. v.156, n.1-2, p. 222-226, apr. 2012.

LORETO, E.S. et al. New Insights into the *In Vitro* Susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 7534 -7537, 2014.

MAHAL, D. L. et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.56, n.7, p. 4021-4023, jul. 2012.

MAIA, N.B. Produção e qualidade do óleo essencial de duas espécies de menta cultivadas em soluções nutritivas. 1998. 105f. Tese (Doutorado em Agricultura)- Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1998.

MANAIA, E. B. et al. Multifunction hexagonal liquid-crystal containing modified surface TiO₂ nanoparticles and terpinen-4-ol for controlled release. **International Journal of Nanomedicine**. v.10, n.1, p. 811-819, oct. 2015.

MCMULLAN, W.C. et al. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 170, p. 1293-1297, jun. 1977.

MARCOLONGO-PEREIRA, C. et al. Epidemiologia da pitiose equina na região sul do Rio Grande do Sul. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n.9, p.865-868, set. 2012.

MARINI, V.G. et al. Biodegradable nanoparticles obtained from zein as a drug delivery system for terpinen-4-ol. **Química Nova**.; v. 37, n.5, p.839-843, jun. 2014.

MARTINS J. A. S. et al. Avaliação do efeito do óleo de *melaleuca alternifolia* sobre o crescimento micelial in vitro de fungos fitopatogênicos. **Bioscience Journal**. v.27, n.1, p.49-51, jan/feb. 2010.

MEIRELES, M.C.A. et al. Cutaneous pythiosis in horses from Brazil. **Mycoses**. v. 36, p. 139-142, march. 1993.

MENDOZA, L.; ALFARO, A.A. Equine pythiosis in Costa Rica: Report of 39 cases. **Mycopathologia**, v. 94, p. 123-129, 1986.

MENDOZA, L.; MARIN, G. Antigenic relationship between *Pythium insidiosum* De Cock et al. 1987 and its synonym *Pythium destruens* Shipton 1987. **Mycoses**. v. 32, n. 2, p. 73-77, 1989.

MENDOZA, L. et al. Evaluation of two vaccines for the treatment of pythiosis insidiosum in horses. **Mycopathologia**, v. 119, p. 89-95, aug.1992.

MENDOZA, L.; AJELLO, L.; MCGINNIS, M.R. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médical**,. v. 6, n. 4, p. 151-164, apr.1996.

MENDOZA, L. et al. Serodiagnosis of human and animal pythiosis using an enzymelinked immunosorbent assay. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**. v. 4, n. 6, p. 715-718, nov. 1997.

MENDOZA, L.; NEWTON, J.C. Immunology and immunotherapy of the infections caused by *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v. 43, p. 477-486, 2005.

MENDOZA, L.; VILELA, R. The mammalian pathogenic oomycetes. **Current Fungal Infection Reports**.v.7, n.3, p.198-208, 2013.

MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Australian Veterinary Journal**, v. 57, p. 377-382, 1981.

MILLER, R.I., CAMPBELL, R.S.F. Clinical observations on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**, v. 58, p. 221-226, 1982.

MILLER, R. I. Investigations into the biology os three 'phycomycotic' agents pathogenic for horses in Australia. **Mycopatologia**. v.81, p. 23-28, 1983.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERCOVIK, L. Chemical composition and oxidant effect of glicosidically bound volatile compounds from orégano (*Origanum vulgare* L. spp. *hirtum*).**Food Chemistry**.v.71, n.6, p.79-83, 2000.

MINAMI M. et al. The inhibitory effect of essential oils on herpes simplex virus type-1 replication *in vitro*. **Microbiology and Immunology**. v.47, n.9, p. 681-684. mar. 2003.

MONTEIRO, A.B. **Imunoterapia da pitiose eqüina: teste de eficácia de um imunobiológico e avaliação leucocitária em animais infectados naturalmente pelo *Pythium insidiosum***. 1999. 52 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Universidade Federal de Santa Maria – UFSM, Santa Maria, 1999.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **Internatinal Journal of Pharmaceutics**, v.385, p.113-142, 2010.

MOORE-LANDECKER, J. Fundamentals of the fungi. 4 ed. New Jersey: Prentice Hall, Inc.1996. Cap 3: Zoosporic fungi, p.33-79.

MUGNAINI, L. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporum canis*. Journal de **Mycologie Médicale**, v. 22, n.2, p. 179-184, jun. 2012.

MUGNAINI, L. et al. A herbal antifungal formulation of *Thymus serpyllum*, *Origanum vulgare* and *Rosmarinus officinalis* for treating ovine dermatophytosis due to *Trichophyton mentagrophytes*. **Mycoses**, v. 56, n.3, p. 333-337, feb. 2013.

MURRAY, D.R. et al. Metastatic phycomycosis in a horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v. 172, n. 7, p. 834-836, apr. 1978.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 31, n.4, p.247-256, oct/dez. 2000.

NASCIMENTO, D. M. Controle *in Vitro* do *Fusarium* sp. Causador da Fusariose na Soja. **Cadernos de Agroecologia**. v.9, n.4, p.1-11, nov. 2014.

NCCLS. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard. NCCLS document M38-A [ISBN 1-56238-470-8]. NCCLS, 940 West. Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

OLIVEIRA, A.C.M. et al. Emprego do óleo de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) na odontologia: perspectivas quanto à utilização como antimicrobiano alternativo às doenças infecciosas de origem bucal. **Revista brasileira de plantas medicinais**. v.13, n.4, p.492-499, 2011.

PACKER, J. F.; LUZ, M.M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.1, p.102-107, jan/mar. 2007.

PEREIRA et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. v. 60, n.5, p.1168-1171, nov. 2007

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia** v. 32, n.3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PEREIRA DIB, BOTTON SA, AZEVEDO MI. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v.176,p.309–15, 2013;

PEREIRA, D.I.B. et al.; Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial and Chemother.** 60, 1168–1171, nov. 2007 PEREIRA, D.I.B. **Suscetibilidade *in vitro* e *in vivo* de *Pythium insidiosum*: Estudo comparativo entre acetato de caspofungina e imunoterapia em coelhos.** 2008. 85 f. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul – UFRGS, Porto Alegre, 2008.

PEREIRA, D.I.B. et al. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v. 176, p. 309-315, oct. 2013.

PEREIRA, M. C. et al. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciências Agrotécnicas**, Lavras. v. 30; p. 731-738; jul/aug. 2006.

PÉREZ, R.C. et al. Epizootic cutaneous pythiosis in beef calves. **Veterinary Microbiology**. v. 109, n. (1-2), p. 121-128, aug. 2005.

RAKICH, P.M.; GROOTERS A.M.; TANG K. Pythiosis in two cats. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v. 17, p. 262-269, 2005.

RAO, A. et al. Mechanism of antifungal activity of terpenid phenols resembles calcium stress and inhibition of the TOR pathway. **Antimicrobial of Agents and Chemother**; v. 5, p.5062-5069, dec. 2010.

RAMOS, E. T. A. Bactericidal activity hydroalcoholic extracts rubrastilis and lemon grass and essential oils oregano, thyme and melaleuca on *Xanthomonas albilineans*. **Cadernos UniFOA**. n.19, agos. 2012.

REIS, C. P. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug - loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine**, v.2, n.1, p. 8-21, 2006.

RMIERRE, C. et al. Pythiosis in Africa. **Emerging Infectious Disease**. v. 11, n. 3, p. 479-481, mar. 2005.

RUSSEL, M.; SOUTHWELL, I. Monoterpenoid accumulation in *Melaleuca alternifolia* seedlings. **Phytochemistry**, v. 59, n. 7, p. 709-716, 2002.

SAGAVE L. et al. Atividade de nanoformulações de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-

4-ol em isolados de *Rhodococcus equi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v. 67, n.1, p.221-226.mar. 2015.

SANTOS, R.C.V. et al. Antimicrobial activity of tea tree oil nanoparticles against American and European foulbrood diseases agents. **Journal of Asia-Pacific Entomology**. v.17, n.3, p. 343-347, sept. 2014.

SANTURIO, J.M. et al. Cutaneous Pythiosis insidiosus in calves from the Pantanal region of Brazil. **Mycopathologia**. v. 141, p 123-125, oct. 1998.

SANTURIO, J.M.et al. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinarie**. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola.v. 34, n. 1, p. 1-14, aug. 2006.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella entérica* de origem avícola. **Ciência Rural**. v.37, n.3, p.803-808. mai/jun, 2007.

SANTURIO, J.M. et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidiosus developed and evaluated. **Vaccine**, v. 21, p. 2535-2540, 2003.

SCHAFFAZICK, S. R.; GUTERRES, S. S. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v.26 n.5, p.726-737, 2003.

SHENEP, J.L. et al. Successful medical therapy for deeply invasive facial infection due to *Pythium insidiosum* in a child. **Clinical Infectious Disease**. v. 27, n. 6, p. 1388-1393, dec. 1998.

SHIPTON, W.A. *Pythium destruens* sp., nov., na agent of equine pythiosis. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**. v. 25, p. 137-151, 1987.

SEKHON, A.S.; PADHYE, A.A.; GARG, A.K. In vitro sensitivity of *Penicillium marneffei* and *Pythium insidiosum* to various antifungal agents. **European Journal of Epidemiology**. v. 8, n. 3, p. 427-432, 1992.

SIMÕES, R.P. et al. Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre infecção estafilocócica. **Revista Icta**. v.20, n.2, p.143-152, jul/dez. 2002.

SOUZA M.E. et al. Antimycobacterial and antifungal activities of *Melaleuca alternifolia* oil nanoparticles. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**.v.24, n.5, p. 559-560. jan. 2014.

SOYLU EM, SOYLU S, KURT S. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Pytophora infestans*. **Mycophatologia**.v.161, n.2,p. 119-26, 2006.

SRIPHANA U. et al. New ligman esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**. v.91, p. 39-43, dec. 2013a.

SPRIPHANA, U. et al. Clauralia e from the roots of *Clausena harmandiana* and antifungal activity againt *Pythium insidiosum*. Archives of **Pharmacal Research**, v. 36, p.1078-1083, sept. 2013 b.

SUDJARITRUK, T.; SIRISANTHANA, V. Successful treatment of a child with vascular pythiosis. **BMC Infectious Diseases**, v. 29, n.11, p. 33, 2011.

SUTHIWONG J. et al. Coumarinoid from the fruits of *Micromelum facatum*. **Fitoterapia**. v.94, p.134-141, apr. 2014.

TABOSA, I.M. et al. Outbreaks of pythiosis in two flocks of sheep in northeastern Brasil. **Veterinary Pathology**. v. 41, p. 412-415, jul. 2004.

TRISCOTT J.A. et al. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**. v. 20, n. 3, p. 267-271, jun.1993.

TYAGI, A.K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food control**, v. 22; p. 1707-1714, 2011.

VAZQUEZ, J. A. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier--are we there yet? **Medical Mycology**. v.41, n.5, p.355-368, 2003.

VIDELA, R. et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Medical Mycology**. v. 50, n.2, p. 219-224, feb.2012.

VOKOU, D.; KOKKINI, S.; BESSIERE, J.M. Geographic variation of Greek oregano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) essential oils. **Biochemical Systematics and Ecology**.v.21, n.2, p.287- 295, 1993.

ZANETTE R.A. et al. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**.; v25, n.1, p. 91-94, mar. 2015.

ZAMBONELLI et al. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi *in vitro*. **Journal of Phytopathology**. v.144, n.9-10, p. 491-494, nov.1996.

ZHU L.; GIL-LAMAGNÈRE C.; MÜLLER F.C. Effects of several antifungal drug combinations against clinical and environmental isolates of *Cryptococcus neoformans* from China. **Mycoses**.v.47, n.7, p.319-25, aug. 2004.

WHITE, T. C.; MARR, K. A.; BOWDEN R. A. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. **Clinical Microbiology Reviews**. v.11, n.2, p.382-402, apr. 1998.

WOGIATZI, E. et al. Chemical composition and antimicrobial effects of greek *Origanum* species essential oil. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**., v. 23, p.1322-1324, mar. 2009.