

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



Tese

Atividade *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos de plantas medicinais e nanopartículas de prata sobre *Pythium insidiosum*

Júlia de Souza Silveira Valente

Pelotas, 2020

Júlia de Souza Silveira Valente

Atividade *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos de plantas medicinais e nanopartículas de prata sobre *Pythium insidiosum*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas (Área do conhecimento: Parasitologia).

Orientadora: Daniela Isabel Brayer Pereira

Pelotas, 2020

Júlia de Souza Silveira Valente

Atividade *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos de plantas medicinais e nanopartículas de prata sobre *Pythium insidiosum*

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

Data da Defesa: 20/03/2020

Banca examinadora:

Profª. Drª. Daniela Isabel Brayer Pereira (Orientadora)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profª. Drª. Sônia de Avila Botton
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Santa Maria

Drª. Anelise de Oliveira Fonseca
Doutora em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Drª Luiza da Gama Osório
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Drª Cristina Gomes Zambrano
Doutora em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Pelotas

Profª. Drª. Daiane Drawanz Hartwig
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

Agradecimentos

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

À minha família pela educação e valores pessoais, 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 e pela ajuda nos experimentos *in vivo* diversas vezes.

À minha querida orientadora professora Dr^a. Daniela Brayer Pereira por me ensinar desde os primeiros passos, desde a iniciação científica até a pós-graduação, sempre me incentivando e exigindo minha máxima dedicação durante esse percurso de 11 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. Luciano Aparecido Pannagio por me ceder as nanopartículas de prata, as quais foram a principal descoberta da tese.

À minha querida amiga Carolina Litchina Brasil a qual foi meu braço direito durante todo o experimento *in vivo* até mesmo nos feriados de natal e ano novo.

À minha querida amiga Cristina Zambrano que mesmo tendo concluído seu doutorado se prontificou a me ajudar no experimento *in vivo*.

Ao colega Ândrios Moreira que mesmo estando em outro laboratório me ajudou com as estatísticas e com a formatação das figuras dos artigos.

À professora Simone Sallis e sua equipe da patologia que nos auxiliaram na análise histopatológica.

Ao professor Mauro Pereira pela ajuda com as microscopias e interpretações das imagens.

À Simone Silva que também ajudou no preparo do material para a realização das microscopias.

À amiga e colega Helen Cabaldi pela ajuda com os exames clínicos.

À equipe do CEME-SUL da FURG pela realização das microscopias eletrônicas.

À professora Dr^a. Sônia de Avila Botton pelo apoio nas correções dos artigos e por estar sempre presente nas bancas e eventos.

À professora Dr^a Daiane Hartwig e suas orientadas Suzane e Marcell pela ajuda com a redação da patente e os testes de citotoxicidade.

Ao laboratório de Virologia e mais especificamente à professora Dr^a Silvia Hubner, o professor Jeferson Fischer e os técnicos de laboratório Zeca e Paulo Rodrigues pela ajuda com os testes de citotoxicidade e todo o treinamento sobre cultivo celular.

À minha amiga Giordana Perez 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 Microbiologia e 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, Julia de Souza Silveira. **Atividade *in vitro* e *in vivo* de compostos bioativos de plantas medicinais e nanopartículas de prata sobre *Pythium insidiosum***. 2020. 102f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Pythium insidiosum pertence ao filo Oomycota. Infecta mamíferos causando uma doença grave denominada pitiose, que afeta principalmente equinos (no Brasil) e humanos (na Tailândia). Apesar do avanço das pesquisas, o tratamento da pitiose ainda não está completamente estabelecido. O presente estudo avaliou a ação antimicrobiana *in vitro* de compostos bioativos de plantas medicinais e nanopartículas de prata frente a isolados brasileiros de *P. insidiosum*, bem como verificou a ação da nanoemulsão de *Melaleuca alternifolia* e de nanopartículas de prata no tratamento da pitiose experimental. Os testes de suscetibilidade seguiram o protocolo M38-A2 do CLSI. Os danos na ultraestrutura das hifas de *P. insidiosum* foram verificados através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia Eletrônica de Transmitância (MET). O experimento *in vivo* consistiu na indução da pitiose em coelhos da raça Nova Zelândia os quais foram monitorados e tratados diariamente com bioAgNP por via tópica e intralesão e *M. alternifolia* por ambas as vias. A suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* (n=38) frente a bioAgNP mostrou MIC₅₀ (concentração inibitória mínima capaz de inibir 50% dos isolados) foi de 0,24mg/L e a MIC₉₀ (concentração inibitória mínima capaz de inibir 90% dos isolados) foi de 0,47mg/L. Adicionalmente, a análise de MEV evidenciou que as hifas de *P. insidiosum* tratadas com bio-AgNP exibiam rugosidades na superfície, bem como foi observado que a parede celular apresentou muitas áreas de retração, perda da continuidade, presença de áreas de descamação e rompimento em algumas regiões. Na MET das hifas tratadas com esse composto não foi possível diferenciar as estruturas das organelas, bem como a parede celular apresentava-se rarefeita, com as bordas enrugadas e parcialmente rompida. A suscetibilidade de 34 isolados de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *M. alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita* e *Eugenia caryophyllata* e a seus respectivos compostos majoritários α - terpineol, carvacrol, mentol e eugenol evidenciou que o componente bioativo mais eficaz na eliminação do oomiceto foi o α - terpineol com CIM variando entre 7,82-125 μ g/mL. Quando a CIM do composto majoritário e do seu óleo essencial de origem foram comparadas, observou-se que os compostos bioativos α -terpineol e carvacrol tiveram ação anti-*Pythium* superior ($P<0.05$) aos seus óleos de origem *M. alternifolia* e *O. vulgare*, sugerindo que esses compostos podem ser responsáveis pela atividade inibitória desses óleos essenciais frente a *P. insidiosum*. Na terapêutica da pitiose experimental, com exceção dos coelhos tratados com formulação tópica de *M. alternifolia*, as lesões dos demais grupos tratados nas diferiram do grupo controle ($P<0.05$). Observou-se que um animal tratado com formulação tópica de BioAgNP apresentou cura clínica aos 35 dias de tratamento. Os resultados observados no presente estudo ampliam as perspectivas para o desenvolvimento de novos medicamentos com atividade efetiva no controle da pitiose.

Palavras-chave: Oomiceto; Nanocompostos; Óleos Essenciais; Compostos Majoritários; Suscetibilidade; Pitiose; Reprodução Experimental; Coelhos; Oomicida

Abstract

Valente, Julia de Souza Silveira. ***In vitro* and *in vivo* activity of bioactive compounds from medicinal plants and silver nanoparticles on *Pythium insidiosum***. 2020. 102f. Tese (Doutor em Ciências Biológicas) – Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2020.

Pythium insidiosum belongs to the phylum Oomycota. It infects mammals causing a serious disease called pythiosis, which mainly affects horses (in Brazil) and humans (in Thailand). Despite the advances in research, the treatment of pythiosis is not yet fully established. The present study evaluated the *in vitro* antimicrobial action of bioactive compounds from medicinal plants and silver nanoparticles against Brazilian isolates of *P. insidiosum*, as well as verified the action of the nanoemulsion of *Melaleuca alternifolia* and silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis. The susceptibility tests followed the CLSI protocol M38-A2. The damage to the ultrastructure of the *P. insidiosum* hyphae was verified using Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmittance Electron Microscopy (MET). The *in vivo* experiment consisted of inducing pythiosis in New Zealand rabbits, which were monitored and treated daily with bioAgNP by topical and intralesion and *M. alternifolia* by both routes. The *in vitro* susceptibility of *P. insidiosum* (n = 38) against bioAgNP showed MIC₅₀ (minimum inhibitory concentration capable of inhibiting 50% of the isolates) was 0.24mg / L and MIC₉₀ (minimum inhibitory concentration capable of inhibiting 90% of the isolated) was 0.47mg / L. In addition, SEM analysis showed that *P. insidiosum* hyphae treated with bio-AgNP exhibited roughness on the surface, as well as that the cell wall showed many areas of retraction, loss of continuity, presence of areas of flaking and rupture in some regions. In the MET of the hyphae treated with this compound, it was not possible to differentiate the structures of the organelles, as well as the cell wall was rarefied, with the edges wrinkled and partially broken. The susceptibility of 34 isolates of *P. insidiosum* to essential oils of *M. alternifolia*, *Origanum vulgare*, *Mentha piperita* and *Eugenia caryophyllata* and their respective major compounds α -terpineol, carvacrol, menthol and eugenol showed that the most effective bioactive component in the elimination of the oomycete was α -terpineol with MIC ranging between 7.82-125 μ g / mL. When the MIC of the major compound and its essential oil of origin were compared, it was observed that the bioactive compounds α -terpineol and carvacrol had superior anti-*Pythium* action (P <0.05) to their oils of *M. alternifolia* and *O. vulgare*, suggesting that these compounds may be responsible for the inhibitory activity of these essential oils against *P. insidiosum*. In the treatment of experimental pythiosis, with the exception of rabbits treated with topical formulation of *M. alternifolia*, the lesions of the other groups treated in differed from the group control (P <0.05). It was observed that an animal treated with a topical formulation of BioAgNP presented clinical cure after 35 days of treatment. The results observed in the present study expand the prospects for the development of new drugs with effective activity in the control of pythiosis.

Keywords: Oomycete; Nanocomposites; Essential Oils; Major Compounds; Susceptibility; Pythiosis; Experimental Reproduction; Rabbits; Oomycide

Lista de Figuras

Revisão de Literatura

Figura 1	Modelo sugerido para explicar o mecanismo de ação dos óleos essenciais e/ ou seus componentes bioativos.....	30
----------	--	----

Artigo 1

Figure 1	<i>Pythium insidiosum</i> ultrastructure (CBS 101555) visualized in SEM. (A) Control sample (untreated). Coenocytic hyphae with turgid appearance showing a smooth and homogeneous surface. (B) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Hyphae showing surface roughness and areas with increased electron density. (C) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Hypha showing multiple areas with retraction and loss of continuity of cell wall interspersed with areas of electron density increase. (D) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Hyphae are retracted and the cell wall is desquamated and ruptured in some areas.....	41
Figure 2	<i>Pythium insidiosum</i> ultrastructure (CBS 101555) visualized in TEM. (A) Control sample (untreated). Cytoplasm exhibiting mitochondria (arrow), lipid (L) and Golgi apparatus (arrowhead). (B) Control sample (untreated). Cell wall thick and homogeneous (arrow). (C) Sample treated with 0.12 µg/mL bio-AgNP. The cell wall is weakly impregnated by osmium and with multiple electron-dense areas (arrow). Intracytoplasmic elements are homogeneous and the organelle structure is not differentiated. (D) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Thinned wall with wrinkled edges (arrow) and electron dense areas (arrowhead) can also be found. The upper region the cell wall is rough and partially ruptured. Intracytoplasmic organelles have disappeared, remaining only some homogeneous-looking material (*)......	41

Artigo 2

- Figure 1 Subcutaneous lesion areas in rabbits experimentally inoculated with zoospores of *Pythium insidiosum* and treated with bio-AgNP. (♦) Control, (▲) gel formulation bio-AgNP, (■) intralesion bio-AgNP. Bio-AgNP, biogenic silver nanoparticles. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*..... 47
- Figure 2 Subcutaneous tissue of rabbits experimentally inoculated with zoospores of *Pythium insidiosum* and treated with bio-AgNP. *P. insidiosum* hyphae with thick, brown, and irregularly branched walls (arrows). (A) Control group: the hyphae are dispersed in the field. (B) Gel formulation bio-AgNP. (C) Intralesion bio-AgNP: the hyphae are concentrated in the areas of necrosis and it can be observed that there is less amount of oomycete hyphae in the tissues. (D) Gel formulation bio-AgNP: corresponds to the clinically healed animal. Note the absence of hyphae in this necrosis area. Grocott methenamine silver (GMS) stain. 10× Objective. Scale bar (600 µm). Bio-AgNP, biogenic silver nanoparticles. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*..... 48

Lista de Tabelas

Artigo 1

Table 1	In vitro susceptibility of <i>Pythium insidiosum</i> (n = 38) to bio-AgNP formulation.....	40
---------	--	----

Artigo 2

Table 1	Regression equations for the lesions' dimensions in each of the evaluation days for each group of rabbits inoculated experimentally with zoospores of <i>Pythium insidiosum</i> and treated with bio-AgNP.....	47
---------	--	----

Manuscrito 1

Tabela 1	Dados demonstrando a área da lesão (A) e a progressão da lesão (%) de coelhos do grupo 1 (Controle) inoculados com zoósporos de <i>P. insidiosum</i>	69
Tabela 2	Dados demonstrando a área da lesão (A) e a progressão da lesão (%) dos coelhos do grupo 2 inoculados com zoósporos de <i>P. insidiosum</i> e tratados com uma formulação à base de gel de nanoemulsão de <i>M. alternifolia</i>	70
Tabela 3	Dados demonstrando a área da lesão (A) e a progressão da lesão (%) dos coelhos do grupo 3 inoculados com zoósporos de <i>P. insidiosum</i> e tratados com nanoemulsão de <i>M. alternifolia</i> intralesão.....	71

Manuscrito 2

Tabela 1	Variação de CIM, CIM50 e CIM90 dos óleos essenciais <i>Eugenia caryophyllata</i> , <i>Melaleuca alternifolia</i> , <i>Mentha piperita</i> e <i>Origanum vulgare</i> e seus respectivos componentes majoritários eugenol, α -terpineol, mentol e carvacrol frente a isolados de <i>P. insidiosum</i> (n=34).....	86
----------	--	----

SUMÁRIO

1 Introdução.....	14
2 Objetivos.....	17
2.1 Objetivo geral.....	17
2.2 Objetivos específicos.....	17
3 Revisão de literatura.....	18
3.1 <i>Pythium insidiosum</i>	18
3.2 Pitiose.....	21
3.2.1 Pitiose equina.....	22
3.2.2 Pitiose canina.....	23
3.2.3 Espécies animais com menor incidência de pitiose.....	24
3.2.4 Pitiose humana.....	24
3.2.5 Pitiose experimental.....	25
3.3 Métodos terapêuticos.....	26
3.3.1 Antimicrobianos no tratamento da pitiose.....	27
3.3.2 Óleos essenciais.....	29
3.3.2.1 <i>Melaleuca alternifolia</i>	31
3.3.2.2 Componentes majoritários de óleos essenciais.....	32
3.3.3 Nanocompostos.....	34
3.3.3.1 Nanopartículas de prata.....	34
4 Artigos.....	37
4.1 Artigo 1. <i>In vitro</i> anti- <i>Pythium insidiosum</i> activity of biogenic silver nanoparticles.....	37
4.2 Artigo 2. Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy.....	44
5 Manuscritos.....	51
5.1 Manuscrito 1. Formulações de <i>Melaleuca alternifolia</i> no tratamento da pitiose experimental.....	51
5.2 Manuscrito 2. Atividade anti- <i>Pythium insidiosum</i> de compostos bioativos oriundos de plantas medicinais.....	72
6 Conclusões gerais.....	87

Referências.....	88
Anexos.....	97
Anexo A. Documento de aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal- UFPel: Ratos Wistar.....	98
Anexo B. Documento de aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal-UFPel: Coelhos Nova Zelândia.....	99
Anexo C. Tabelas suplementares do Artigo 2.....	100

1 Introdução

Pythium insidiosum é o agente etiológico da pitiose em mamíferos (GAASTRA et al., 2010). Trata-se de uma doença de caráter invasivo de rápida progressão e que apresenta altas taxas de mortalidade devido à resistência recorrente em alguns protocolos terapêuticos (HILTON et al., 2016). Essa doença possui distribuição mundial e acomete principalmente equinos, no Brasil, com maior número de relatos na região Sul do país e Pantanal mato-grosense, e em humanos, com elevado número de infecções na Tailândia (LEAL et al., 2001; MARCOLONGO-PEREIRA, 2012; WEIBLEN et al., 2015; KRAJAEJUM et al., 2018; ROMERO et al., 2019). Segundo Miller (1983) a pitiose é descrita em regiões alagadas ou pantanosas de clima tropical, subtropical e temperado.

Pythium insidiosum está classificado no Reino Straminipila, Classe Peronosporomycetes (Oomycota), Ordem Pythiales e Família Pythiaceae. Determinadas características bioquímicas dos oomicetos tais como a ausência de quitina e uma grande quantidade de β -glucanas na parede celular o distanciam filogeneticamente dos fungos verdadeiros, tornando-o mais próximo das algas diatomáceas (HUDSPETH et al., 2000). Por possuir uma via incompleta de biossíntese de esteróis, *P. insidiosum* necessita incorporar esteróis exógenos à sua membrana célula. Este fato justifica, em parte, a resistência de *P. insidiosum* e os insucessos nos tratamentos que utilizam antifúngicos, os quais têm ação sobre os esteróis de membrana (LERKSUTHIRAT et al., 2017).

A busca por tratamentos efetivos contra a pitiose impulsionou o desenvolvimento de diversas pesquisas que visam à formulação de protocolos terapêuticos eficazes para combater a enfermidade. Nesse sentido, destacam-se as pesquisas com fármacos da classe dos antibacterianos (ITAQUI et al., 2016; JESUS et al., 2016; BAGGA et al., 2018; CHATTERJEE; AGRAWAL, 2018; LORETO et al., 2018, 2019), antifúngicos, tais como caspofungina, micafungina, terbinafina (PEREIRA et al., 2007; ZANETTE et al., 2015; JESUS et al., 2015 ITAQUI et al., 2016) óleos essenciais e compostos naturais (ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; VALENTE, 2016a, b; TROLEZI; AZANHA, 2017), nanocompostos (VALENTE et al., 2016a) e compostos metálicos (RIBEIRO et al., 2017).

As plantas medicinais são conhecidas por apresentarem propriedades farmacológicas, incluindo atividade antimicrobiana, analgésica, anestésica e anti-

1 inflamatória (NASCIMENTO et al., 2000; BAKKALI et al., 2008). Estudos
2 empregando plantas medicinais comprovaram o potencial antimicrobiano frente a
3 vírus (MINAMI et al., 2003), bactérias (SAGAVE et al., 2015), parasitos
4 (BALDISSERA et al., 2014), fungos (CLEFF et al., 2010 a, b) e oomicetos, incluindo
5 *P. insidiosum* (SRIPHANA et al., 2013; SUTHIWONG et al., 2014; FONSECA et al.,
6 2015a, b; JESUS et al., 2015b; VALENTE, 2016 a, b, c).

7 Diversos óleos essenciais de plantas medicinais foram avaliados sobre
8 isolados de *P. insidiosum*, tais como *Origanum vulgare*, *Origanum marjorana*,
9 *Rosmarinus officinalis*, *Mentha piperita* e *Melaleuca alternifolia* (FONSECA et al.,
10 2015a; VALENTE et al., 2016a, b, c). No tratamento da pitiose experimental em
11 formulação de uma base de gel não ionizável, a utilização de *M. piperita* e *Origanum*
12 *vulgare* apresentou resultados bastante promissores, mostrando ser uma alternativa
13 propícia a ser associada ao tratamento da enfermidade (FONSECA et al., 2015b).

14 Os componentes majoritários dos óleos essenciais são descritos como
15 responsáveis por grande parte da sua ação antimicrobiana (SOYLU; KURT, 2006;
16 HUSSAIN et al., 2011; FONSECA et al., 2015a). Nesse sentido os compostos
17 carvacrol e timol que podem ser encontrados no óleo de *O. vulgare* foram
18 empregados sobre isolados de *P. insidiosum* demonstrando efeitos letais sobre o
19 oomiceto (JESUS et al., 2014). Segundo Rao et al. (2010) esses compostos podem
20 ter uma ação mais eficaz sobre os micro-organismos quando comparados ao óleo
21 essencial como um todo.

22 A utilização de tecnologias inovadoras na formulação de compostos com ação
23 anti-*Pythium insidiosum* também é descrita com resultados bastante interessantes.
24 Ao comparar *Melaleuca alternifolia* em uma formulação livre e em nanoemulsão
25 sobre isolados de *P. insidiosum*, nosso grupo de pesquisa observou que as
26 nanoemulsões melhoram a eficácia do óleo (VALENTE et al., 2016a).

27 Nanopartículas de prata (AgNPs) são compostos que possuem potentes
28 propriedades antimicrobianas, fato que as tornam muito visadas pela indústria
29 farmacêutica, alimentícia e na medicina (ALLAKER; MEMARZADEH, 2014; YU et al.,
30 2019; RUGIDO-SANTOS, et al., 2019). Na indústria farmacêutica são utilizados na
31 formulação de cremes ou soluções de nitrato de prata a serem aplicados na
32 prevenção de queimaduras, ferimentos e ulcerações da pele (WU et al., 2014). Na
33 área da saúde destaca-se a ação das AgNPs sobre larvas de mosquitos do gênero
34 *Aedes* sp. e *Culex* sp., vetores de importantes doenças em saúde pública como

1 dengue e filariose (GHOSH; CHOWDHURY; CHANDRA, 2012). Também são
2 aplicados em estudos que visam a formulação de antimicrobianos com ação sobre
3 micro-organismos causadores de infecções resistentes e recorrentes de etiologia
4 bacteriana (GOYAL et al., 2018), viral (SZYMAŃSKA et al., 2018) e fúngica
5 (RADHAKRISHNAN et al., 2018), o que torna esse composto um potencial aliado
6 para a terapêutica de doenças persistentes como a pitiose.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar a ação antimicrobiana *in vitro* de compostos bioativos de plantas medicinais e nanopartículas de prata frente a isolados brasileiros de *P. insidiosum*, bem como verificar a ação da nanoemulsão de *Melaleuca alternifolia* e de nanopartículas de prata no tratamento da pitiose experimental.

2.2 Objetivos específicos

- Testar a suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* frente às nanopartículas biogênicas de prata (bioAgNP);
- Avaliar as alterações morfológicas e danos ocasionados pelas nanopartículas de prata sobre as células de *P. insidiosum*;
- Averiguar a eficácia da utilização de formulações contendo nanopartículas de prata e de nanoemulsão de *Melaleuca alternifolia* no tratamento da pitiose experimental em coelhos;
- Verificar a suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* frente aos compostos bioativos de plantas medicinais: carvacrol, α -terpineol, mentol e eugenol e correlacionar com as concentrações inibitórias mínimas (CIM) observadas para seus respectivos óleos de origem: *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Eugenia caryophyllata*.

3 Revisão de literatura

3.1 *Pythium insidiosum*

Os oomicetos são micro-organismos aquáticos com 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 e características moleculares e bioquímicas distintas, como uma rota alternativa para a síntese do aminoácido lisina (MOORE-LANDECKER, 1996; ALEXOPOULOS et al., 1996). A classificação taxonômica do grupo dos oomicetos abrange diversos gêneros tais como: *Pythium*, *Phytophthora*, *Hyaloperonospora*, *Albugo*, *Saprolegnia* e *Aphanomyces* (KWON-CHUNG, 1994).

O gênero *Pythium* compreende mais de 250 espécies descritas, dentre essas, 50% são reconhecidas pela comunidade científica e classificadas dentro de 11 grupos filogenéticos (LÉVESQUE; DE COCK, 2004; ZIPCODEZOO, 2011; KAGEYAMA, 2014).

As espécies de *Pythium* são geneticamente diferentes e exibem variações em termos de virulência, hospedeiro e distribuição mundial (JIANG; TYLER, 2012; ADHIKARI et al., 2013). A maioria dessas espécies é de grande importância agrônômica, pois são sapróbias ou patógenos facultativos de plantas. Podem ser também patógenos de algas, peixes, insetos e mamíferos. Habitam ecossistemas de água doce, salgada e ambiente terrestre (KAGEYAMA, 2014).

Durante muitos anos *P. insidiosum* foi a única espécie descrita como patógeno para mamíferos, causando uma enfermidade denominada pitiose (MENDOZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996). Entretanto, os relatos de infecção por *Pythium aphanidermatum* em soldados do Afeganistão apontam que outras espécies do gênero podem ser patogênicas (CALVANO et al., 2011; FARMER et al., 2015).

A classificação e taxonomia de *P. insidiosum* bem como a nomenclatura da pitiose 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 uma doença granulomatosa cutânea crônica em equinos que denominaram “bursattee”

(GROOTERS, 2003). Todavia, a identificação da doença era bastante imprecisa por conta da similaridade das lesões de pitiose com as ocasionadas por habronemose 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) a partir 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) classificaram *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). Desta forma, *P. insidiosum* é classificado como parte dos Straminopiles, Alveolata e Rhizaria (SAR), um super-grupo do reino Straminipila (Adl et al., 2012; Beakes et al., 2014), filo Oomycota, família Pythiaceae, gênero *Pythium* e espécie *P. insidiosum* (ALEXOPOULOS et al., 1996).

Estudos de 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 Grooters (2003) 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).

Análises filogenéticas sugerem que o gênero *Pythium* é polifilético, ou seja, suas espécies descendem de dois ou mais ancestrais independentes. Considerando este fato, alguns autores sugerem a criação de cinco novos gêneros em uma nova revisão de sua taxonomia (UZUHASHI et al., 2010; HUANG et al., 2013).

Estudos taxonômicos, baseados principalmente na morfologia do esporângio (filamentoso, alongado ou globoso) sugerem que *Pythium* pode ser dividido em 10 clados (de A a J), estando a espécie *P. insidiosum* no clado C (LEVESQUE; DE COCK, 2004; MCCARTHY; FITZPATRICK, 2017; MCGOWAN; FITZPATRICK, 2017; UZUHASHI et al., 2010). Adicionalmente, estudos filogenéticos sugerem que *P. insidiosum* pode ser agrupado de acordo com sua origem e distribuição geográfica. Nesse contexto Schurko et al. (2003) sugere a classificação de isolados de diferentes origens em 3 clados: clado I com isolados originários das Américas, clado II com isolados da Ásia e Austrália, incluindo *P. destruens* e clado III que estaria filogeneticamente mais distante dos clados citados, envolvendo isolados da Tailândia e um dos EUA. De acordo com diversos estudos filogenéticos existiriam

duas possibilidades de agrupamentos: a constituição de um complexo de diferentes isolados pretencentes a uma única espécie ou um complexo filogenético de espécies intimamente relacionadas (KAMMARNJESADAKUL et al., 2011; AZEVEDO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2017).

3.2 Pitiose

A pitiose é uma doença que acomete animais domésticos (equinos, caninos, bovinos, felinos, caprinos e ovinos), selvagens (aves e mamíferos) e humanos (GAASTRA et al. 2010). Ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, sendo endêmica em diversos países. A doença acomete principalmente equinos, com frequentes registros no Brasil (TABOSA et al., 1999; LEAL et al., 2001; MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012; SOUTO et al., 2016); alguns relatos no Uruguai (ROMERO et al., 2019; SCHANZEMBACH et al., 2019) e humanos, com diversos casos de infecção na Tailândia (KRAJAEJUM et al., 2018) e alguns relatos no Sul da Índia (KRAJAEJUM et al., 2018).

Em grande parte dos casos relatados, nota-se a exposição dos indivíduos a ambientes alagados, o que demonstra que condições ambientais são imprescindíveis para o desenvolvimento e a reprodução de *P. insidiosum* e ocorrência da enfermidade (GAASTRA 2010; KRAJAEJUM et al., 2018; MACHADO et al., 2018). Esse fato se deve ao ciclo biológico do oomiceto, que requer ambiente aquático de águas lânticas 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). Dessa forma, os ambientes aquáticos constituem uma potencial fonte de transmissão, uma vez que os animais adquirem a doença ao entrar em contato com esses ambientes.

3.2.1 Pitiose equina

O equino é o animal doméstico mais afetado. Nestes animais a pitiose ocasiona o desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, que se desenvolvem rapidamente formando grandes massas teciduais com irregularidades nas bordas e aparência tumoral, localizadas predominantemente nas extremidades. Na porção interna das lesões, encontra-se abundante tecido conjuntivo fibroso e 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 serem cruciais para o diagnóstico da enfermidade em equinos, também desempenham papel importante na disseminação de *P. insidiosum* em ambientes alagados, 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., 2014a).

Algumas regiões do Brasil possuem ambientes e clima apropriados para o desenvolvimento de *P. insidiosum*. No Pantanal mato-grossense, a maioria dos casos de pitiose equina foi registrada entre os meses de fevereiro e maio (verão-outono), período que corresponde ao ápice das cheias (LEAL et al., 2001). Similarmente na Paraíba, Tabosa et al. (1999) observaram que os 38 casos de pitiose relatados foram registrados nos meses de julho a outubro, sete a dez meses após o início das chuvas na região.

Souto et al. (2016) relataram 156 casos confirmados de pitiose equina de janeiro de 1986 a dezembro de 2015 na região semiárida do nordeste do Brasil. Desses, dois animais apresentaram pitiose nasal, o restante dos casos apresentaram a forma cutânea/subcutânea da doença ambos tiveram acesso a reservatórios de água.

O Rio Grande do Sul possui um bioma rico em nichos ecológicos propícios para o desenvolvimento e reprodução de *P. insidiosum*. Marcolongo-Pereira et al. (2012) realizaram um levantamento de pitiose equina no estado no período de janeiro de 1979 a julho de 2011. Os autores constataram 63 casos confirmados de pitiose diagnosticados entre os meses de março a julho. Observaram que na maior parte dos casos da enfermidade, o provável mês da infecção apresentava

temperaturas ambientais em torno de 30°C, em pelo menos um dia do mês, o que explicava a ocorrência de alguns casos durante os meses de inverno. Zambrano et al. (2018) sugere que a temperatura pode influenciar no processo de zoosporogênese, estando a temperatura ideal para esse processo acontecer numa faixa entre 20°C e 37°C. De acordo com Miller & Campbell (1982), temperaturas entre 30 e 40°C e acúmulo de água em banhados e lagoas, favorecem a produção de zoósporos condicionando a ocorrência da enfermidade. Os autores acreditam que estas condições sejam determinantes para ocorrência da pitiose em determinadas regiões, uma vez que casos de pitiose normalmente são observados durante ou após a estação chuvosa.

Machado et al. (2018) fizeram um estudo com projeções para as potenciais zonas de risco no Rio Grande do Sul e países vizinhos, uma vez que esses locais constituem um dos maiores e mais disseminados rebanhos de cavalos. Esses autores constataram 66 fazendas soropositivas e com risco de infecção com áreas com baixa vegetação e temperatura adequada para o desenvolvimento do oomiceto. Similarmente, Weiblein et al. (2016) realizaram um levantamento epidemiológico da infecção equina no Estado analisando amostras recolhidas entre setembro e outubro de 2013 abrangendo sete regiões do RS, entre as quais a soroprevalência foi de 11,1%, encontrando o maior índice de soropositividade em regiões de barragem.

Segundo Gaastra et al., (2010) a pitiose equina ocorre no sudeste da Ásia (Índia, Indonésia, Japão, Coreia, Nova Guiné e Tailândia), litoral leste da Austrália e Nova Zelândia, América do Sul (Argentina, Brasil, Colômbia, Venezuela) Costa Rica, Guatemala, Haiti, Panamá e Nicarágua e América do Norte, México e Estados Unidos. Recentemente, também foram detectados focos da doença no Uruguai (ROMERO et al., 2019; SCHANZEMBACH et al., 2019).

Interessantemente houve um relato de pitiose nasal em equino na Tailândia (TONPITAK et al., 2018). Segundo os pesquisadores apesar de haver inúmeros casos de pitiose humana no país, a pitiose equina não havia sido relatada, sendo esse o primeiro registro confirmado da doença nesses animais.

3.2.2 Pitiose canina

A pitiose canina é caracterizada pelo desenvolvimento de piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (MILLER et al., 1983; FOIL et al., 1984; GROOTERS,

2003). Lesões gastrointestinais são mais comumente relatadas nesses animais e caracterizam-se pela formação de grandes massas nas paredes do estômago e intestino que levam a obstrução da luz do órgão (GROOTERS, 2003).

No Brasil, o primeiro relato de pitiose cutânea canina no Brasil foi feito por Larsson et al. (1997) no Estado de São Paulo. Posteriormente, casos de pitiose gastrintestinal e cutânea foram descritos no Rio Grande do Sul (RIET-CORREA et al., 1998; RECH et al., 2004; RODRIGUES et al., 2006; PAVARINI et al., 2007; PEREIRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2013). No Paraná, Paiva et al. (2007) identificaram *P. insidiosum* em um canino com gastrite ulcerativa. Em outros países a pitiose canina também já foi relada principalmente na Venezuela (MENDOZA et al., 2005) e nos Estados Unidos da América (JAEGER et al., 2002; REAGAN et al., 2019; THIEMAN et al. 2019).

3.2.3 Espécies animais com menor incidência de pitiose

Nas demais espécies, incluindo bovinos (PÉREZ et al., 2005; GRECCO et al., 2009; KONRADT et al., 2016), ovinos (TABOSA et al., 2004), caprinos (DO CARMO et al., 2015), felinos (BISSONNETTE et al., 1991; RAKICH et al., 2005; FORTIN et al., 2017; DOWST et al., 2019) e mamíferos selvagens (CAMUS; GROOTERS; AQUILAR, 2004; VIDELA et al. 2012) a enfermidade é esporadicamente relatada (GROOTERS, 2003) e normalmente manifesta-se nas formas, cutâneas/subcutâneas com desenvolvimento de lesões ulcerativas (bovinos, ovinos, caprinos e alguns mamíferos selvagens) e gastroeintestinal (felinos).

3.2.4 Pitiose humana

A pitiose em humanos é uma doença emergente de prognóstico desfavorável. Três formas clínicas da enfermidade são observadas: cutânea, oftálmica e sistêmica (TRISCOTT et al., 1993; IMWIDTHAYA, 1994, 1995; SHENEP et al., 1998; SUDJARITRUCK; SIRISANTHANA, 2011; KEOPRASOM et al., 2012; HILTON et al., 2016). 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, estando geralmente associada à exposição durante as práticas agrícolas (KRAJAEJUM et al., 2006; HILTON et al., 2016). Segundo Hilton et al. (2016),

alguns casos foram relatados na Austrália, Brasil, Haiti, Malásia, Nova Zelândia e EUA.

Na Tailândia a doença está associada 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 cutânea foi relatado por Bosco et al. (2005).

Estudos recentes mostram que o número de relatos de pitiose humana na Tailândia ainda é preocupante e atinge crianças e adultos (CHITASOMBAT et al., 2018; RATHI et al., 2018; PERMALUNG et al., 2019). A forma mais comum é a cutânea/ subcutânea (HILTON et al. 2016), seguida da oftálmica, que segundo Lekhanont et al. (2009), o uso de lentes, trauma e contato com água contaminada favorecem o seu desenvolvimento.

3.2.5 Pitiose experimental

Em algumas enfermidades é necessária a reprodução experimental da doença em animais para melhor avaliar a patogênese, virulência, imunologia, diagnóstico e tratamento. Dessa forma, diferentes espécies têm sido utilizadas como modelo experimental para reprodução e estudo de doenças fúngicas (CAPILA et al., 2007; KIRKPATRICK et al., 2012).

A primeira reprodução experimental da pitiose foi realizada em coelhos por Witkamp (1924). Posteriormente, Miller e Campbell (1983) comprovaram que a doença podia ser reproduzida em coelhos imunocompetentes.

A reprodução experimental da pitiose nesse modelo animal 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 empregado coelhos como modelo experimental para avaliar imunoterapia (SANTURIO et al., 2003, PEREIRA et al., 2008; FONSECA et al., 2015b) e terapias antimicrobianas (PEREIRA et al., 2007; LORETO et al., 2011;

ARGENTA et al., 2012; ZANETTE et al., 2015; FONSECA et al., 2015b, LORETO et al., 2019) como alternativas de tratamento da pitiose. Todavia, na última década diversas pesquisas dedicadas a encontrar novos modelos experimentais para a pitiose têm sido realizadas, incluindo a infecção em *Drosophila melanogaster toll*-deficiente (ZANETTE et al., 2013), camundongos BALB/c imunossuprimidos (TONDOLO et al., 2017) e ovos de galinhas embrionados (VERDI et al., 2018).

3.3 Métodos terapêuticos

Dificuldades no tratamento da pitiose são encontradas em todas as espécies afetadas uma vez que, tratando-se de um pseudo-fungo, *P. insidiosum* possui algumas peculiaridades na sua composição química e estrutural (MENDOZA et al., 2013).

Segundo Lerksuthirat et al. (2017), *P. insidiosum*, assim como os outros oomicetos, possui uma via incompleta de biossíntese de esteróis e por isso carece de ergosterol em sua membrana plasmática. Esse fato implica em falhas no tratamento da enfermidade com fármacos antifúngicos convencionais que atuam sobre o ergosterol da membrana celular fúngica, particularmente os azólicos e a anfortericina B (GAASTRA, 2010; MENDOZA; VILELA, 2013).

A pitiose merece destaque pela dificuldade de tratamento e letalidade às espécies afetadas. Inúmeros tratamentos são utilizados, incluindo cirurgia (KRAJAEJUM et al., 2006; PERMALUNG et al., 2015, BAGGA et al., 2018), imunoterapia (SANTURIO et al., 2003, PEREIRA et al., 2008; FONSECA et al., 2015b), terapia com fármacos antifúngicos (ZANETTE et al., 2015; ITAQUI et al., 2016; JESUS et al., 2015; REAGAN et al., 2019), antimicrobianos (TONDOLO, 2013; JESUS et al., 2014; JESUS, 2016; LORETO, 2018, 2019), óleos essenciais e compostos naturais (FONSECA et al., 2015b, ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; VALENTE, 2016a,b; TROLEZI; AZANHA, 2017).

O sucesso das terapias depende do tamanho, tempo, localização da lesão, idade e estado nutricional do animal (MENDOZA et al., 1997), sendo muito frequentemente, relatos de insucessos terapêuticos e/ou recidivas (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, em alguns casos, é impedido pelas estruturas anatômicas envolvidas, principalmente os membros na pitiose em equinos (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 de equinos não responsivos e em algumas espécies como cães e gatos os resultados são desapontadores (MENDOZA; NEWTON, 2005).

3.3.1 Antimicrobianos no tratamento da pitiose

O Filo Oomycota inclui diversos gêneros tais como: *Pythium*, *Phytophthora*, *Hyaloperonospora*, *Albugo*, *Saprolegnia* e *Aphanomyces*. (Kwon-Chung, 1994). Em uma análise evolutiva, a habilidade de síntese de esteróis presente nos oomicetos do subgrupo Saprolegniales e nos fungos verdadeiros pode ser indício decorrente de algum ancestral em comum. Contudo, alguns oomicetos, pertencentes a grupos não Saprolegniales, perderam algumas enzimas importantes na síntese de esteróis (HMG1, HMG2, ERG1, ERG7, e FRG9) ao longo do trajeto evolutivo. Em contrapartida, esses mesmos micro-organismos aumentaram sua capacidade de adquirir esterol exógeno ampliando o número de genes que codificam proteínas de ligação e obtenção de esterol - o gene da família elicitina. Divergindo com esse grupo, o gene da elicitina não é observado nos oomicetos saprolegniales (JIANG et al., 2006; LERKSUTHIRAT et al. 2015, 2017).

Contudo, várias tentativas de tratamento da pitiose e testes de suscetibilidade *in vitro* frente a *P. insidiosum*, são relatadas empregando fármacos antifúngicos como anfotericina B, azólicos (itraconazol, miconazol e voriconazol), compostos

1 iodínicos, terbinafina, equinocandinas (caspofungina, micafungina), além de
2 antibacterianos incluindo os macrolídeos, tetraciclina, azitromicina, minociclina e
3 aminoglicosídeos (ARGENTA et al., 2012; LORETO et al., 2011, 2012; MAHL e al.,
4 2012; DÓRIA et al., 2012; PEREIRA et al., 2007; 2013; LORETO et al., 2014, 2018;
5 ZANETTE et al., 2015; PERMPALUNG et al., 2019).

6 Embora na grande maioria das pesquisas realizadas constata-se uma baixa
7 correlação entre os resultados dos testes *in vivo* e *in vivo* (PEREIRA et al., 2007;
8 ARGENTA et al., 2012), em alguns estudos relata-se o sucesso da terapia com
9 fármacos antimicrobianos (LORETO et al., 2019), como também com compostos
10 naturais na pitiose experimental (FONSECA et al., 2015). Da mesma forma, Argenta
11 et al. (2012) obteve regressão significativa das lesões de pitiose quando avaliaram
12 os tratamentos combinados com terbinafina, itraconazol e fuvastatina sobre coelhos
13 infectados experimentalmente. Em humanos, Triscott et al. (1993), contrariando os
14 resultados dos testes *in vitro*, observaram resultados positivos no tratamento de
15 pacientes com pitiose periorbital com anfotericina B. Adicionalmente, Shenep et al.
16 (1998) observaram o sinergismo *in vitro* ao combinar itraconazol e terbinafina e *in*
17 *vivo* no tratameto de uma criança com infecção facial. Similarmente, He et al. (2016),
18 obteve sucesso no tratamento de uma criança com ceratite ocular ao associar
19 fluconazol e anfotericina B demonstrando que alguns antifúngicos podem ter efeito
20 no tratamento da pitiose.

21 Relatos da ação de antimicrobianos também demonstram alguns sucessos no
22 tratamento da pitiose. Ramappa et al. (2017), relataram a cura de um caso de
23 ceratite ocular através da administração de colírios com linezolida e azitromicina
24 associados ao uso de azitromicina oral. Russ Castellar (2017), também descreveram
25 a resolução de um caso de pitiose ocular pela associação de minociclina intraocular
26 e oral. Da mesma forma, Chatterjee e Agrawal (2018) descreveram a cura de um
27 menino de sete anos de idade com pitiose ocular, utilizando terapia combinada entre
28 azitromicina e voriconazol tópicos, aliado ao tratamento com azitromicina oral.
29 Similarmente, Bagga et al. (2018) observaram a resposta favorável no tratamento de
30 18 pacientes com pitiose ocular, demonstrando que esses fármacos também podem
31 ser aplicados em alguns casos, particularmente no tratamento da pitiose ocular.

3.3.2 Óleos essenciais

O emprego de óleos essenciais é uma prática antiga que tem sido bastante utilizada na medicina alternativa. A indústria comumente utiliza esses compostos para a produção de bebidas, perfumarias, cosméticos e produtos farmacêuticos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Estudos empregando óleos essenciais e extratos de plantas destacam-se na área de terapia antimicrobiana devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas e, também anticarcinogênicas de alguns compostos bioativos (NASCIMENTO et al., 2000; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são compostos aromáticos originários do metabolismo secundário das plantas. São descritos físico-quimicamente como substâncias líquidas, voláteis, límpidas e raramente coloridas; podendo apresentar lipossolubilidade e solubilidade em solvente orgânico. Sua densidade geralmente é mais baixa que a da água (BAKKALI, AVERBECK et al., 2008; SHARIFI-RAD, et al., 2017). Esses compostos naturais são obtidos por arraste de vapor d'água ou hidrodestilação e a sua atividade antimicrobiana é atribuída à presença de aldeídos, fenóis e alcoóis (BRUNI et al., 2004). O mecanismo de ação (Figura 1) não difere entre as espécies de plantas das quais os óleos são extraídos e envolve a perda da integridade da membrana citoplasmática, saída de íons (hidrogênio, potássio e cálcio) e ausência de função mitocondrial, ocasionando apoptose (DORMAN; DEANS, 2000; SOYLU; KURT, 2006; RAO et al., 2010).

Nos últimos anos, houve um aumento no número de estudos avaliando a ação de óleos essenciais e/ou compostos biativos oriundos de plantas sobre *P. insidiosum*. Essas pesquisas demonstram que esses compostos são capazes de atuar na inibição do crescimento desse importante oomiceto patógeno (SRIPHANA et al., 2013 a, b; SUTHIWONG et al., 2014; JESUS et al., 2015b; FONSECA et al., 2015a, b; ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; VALENTE et al., 2016 a, b, c; TROLEZI; AZANHA, 2017).

Nosso grupo de pesquisa testou a suscetibilidade de isolados brasileiros de *P. insidiosum* frente aos óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae: *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* (FONSECA et al., 2015a). Como resultado observou-se que todos os óleos testados foram capazes de inibir o crescimento do oomiceto, obtendo maior atividade inibitória com a utilização do óleo de *O. vulgare*. A partir dos resultados alcançados nos testes *in*

vitro, foi realizado um ensaio *in vivo* para o tratamento da pitiose, utilizando-se formulações de um gel de base não iônica contendo os óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare* em associação ou combinados com imunoterapia, obtendo cura clínica de um dos animais tratados com a associação dos óleos essenciais (FONSECA et al., 2015b).

Outras pesquisas do nosso grupo de pesquisa também demonstraram a ação dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* em combinação entre si e com os antifúngicos terbinafina e itraconazol, nos quais a combinação entre *M. piperita* e *O. vulgare*, assim como a associação entre *M. alternifolia* e itraconazol demonstraram 65% e 95% de sinergismo respectivamente (VALENTE et al., 2016 b, c).

Araujo, Bosco e Sforcin (2016) avaliaram a atividade de própolis e geoprópolis (compostos que contém óleos essenciais em sua composição) sobre fragmentos de micélio de *P. insidiosum*. Os autores constataram que a própolis teve ação inibitória sobre o oomiceto, entretanto o geoprópolis teve apenas a ação fungistática detectada.

Adicionalmente, nosso grupo de pesquisa constatou que o óleo de girassol ozonizado foi capaz de inibir completamente o crescimento de *P. insidiosum in vitro* e *ex vivo* (ZAMBRANO et al., 2019).

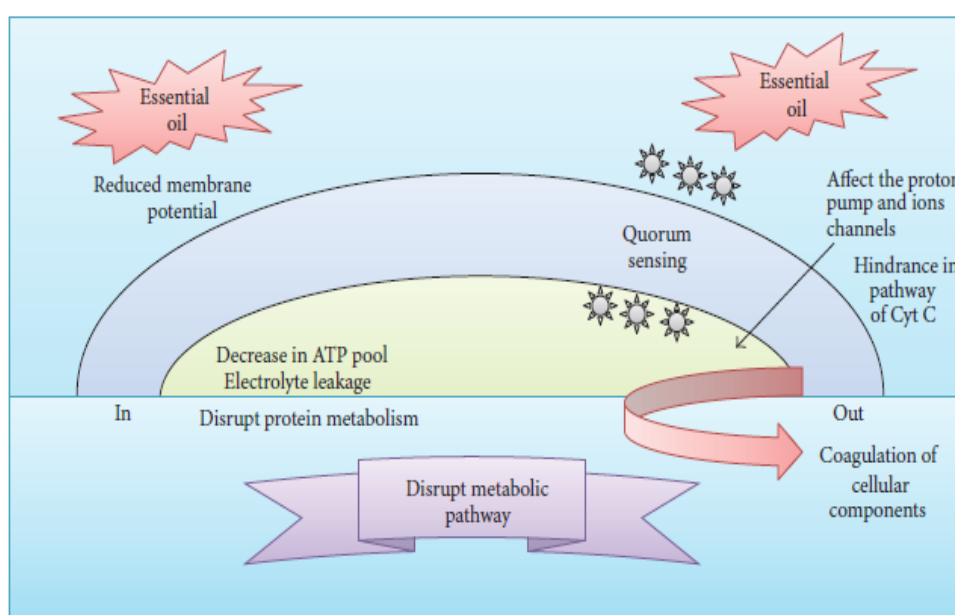


Figura 1: Modelo sugerido para explicar o mecanismo de ação dos óleos essenciais e/ ou seus componentes bioativos. Fonte: SWAMY, AKHTAR E SINNIHAH (2016)

3.3.2.1 *Melaleuca alternifolia*

M. alternifolia (“tea tree” ou árvore do chá) é uma planta que está classificada dentro 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).

Segundo Bakkali et al. (2008), o óleo essencial dessa planta tem funções medicinais atuando como antibacteriano, antifúngico, antiprotzoário e anti-inflamatório. 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).

Devido às suas propriedades antimicrobianas, diversos estudos avaliaram esses compostos sobre bactérias, incluindo *Rhodococcus equi*, *Mycobacterium* sp. e *Listeria monocytogenes* (SANTOS et al., 2014; SOUZA et al. 2014; SAGAVE et al. 2015; BUA et al. 2018; SILVA, 2019). Sua atividade antifúngica frente a fungos fitopatogênicos como *Fusarium* sp., *Macrophomina phaseolina*, *Aclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea* e *Aspergillus ochraceus* foi comprovada por Martins et al. (2010); Lorenzetti et al. (2011) e sobre *Trichophyton rubrum* em estudos publicados por Nascimento et al. (2014); Souza et al. (2014) e Kong et al. (2019). Sua aplicação como inseticida foi relatada por Liao et al. (2018), sendo capaz de causar a desestabilização da mitocôndria de artrópodes, ocasionando a morte dos mesmos.

Dentre as mais diversas aplicações, o óleo essencial de *M. alternifolia* também possui aplicação odontológica impedindo a formação de biofilme dentário e agindo como anti-inflamatório para os tecidos do aparelho bucal (CASARIN et al. 2019), além de atuar como ativador de leucócitos contra *Candida krusei* (TULLIO et al., 2019) e no tratamento de otites (BEZDJIAN et al., 2014).

Em seu estudo, Ramadam et al. (2019) demonstraram que o óleo da árvore-do-chá pode atuar na indução de apoptose em células de melanoma e carcinoma maligno, o que comprova suas propriedades anticarcinogênicas.

Nanocompostos do óleo essencial de *M. alternifolia* possuem propriedades anestésicas demonstradas por Souza et al. (2018) ao utilizar esse composto sobre

caranguejo. Esse tipo de composto também foi descrito com propriedades antifúngicas, atuando sobre fungos dermatófitos (FLORES et al., 2013).

A utilização do óleo essencial de *M. alternifolia* foi relatada pelo nosso grupo de pesquisa, sobre isolados de *P. insidiosum* (VALENTE et al., 2016a). Esse ensaio *in vitro* empregou o óleo na sua forma livre e em nanoemulsão sobre hifas desse oomiceto, concluindo que possuem propriedades anti-*P. insidiosum* e que as nanoemulsões foram capazes de reduzir a concentração inibitória mínima desse composto sobre o patógeno.

3.3.2.2 Componentes majoritários de óleos essenciais

Conforme previamente descrito em pesquisas realizadas pelo nosso grupo, os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *O. vulgare*, *M. piperita* possuem ação anti-*P. insidiosum* conhecidas (FONSECA et al. 2015 a, b; VALENTE et al., 2016 a, b, c). Adicionalmente, ensaios *in vitro* avaliando a ação de *Eugenia caryophyllata* também evidenciaram sua ação antimicrobiana frente a este oomiceto (dados não publicados). Anteriormente, Jesus et al. (2015), demonstraram a atividade anti-*Pythium* do carvacrol, sinalizando que os componentes majoritários podem apresentar maior eficácia sobre este patógeno.

Diversos estudos demonstram que alguns componentes majoritários dos óleos essenciais possuem ação sobre os micro-organismos, sugerindo que estes compostos são os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais (HUSSAIN et al., 2011; TYAGI; MALIK, 2011; BROPHY et al., 1989). Em alguns casos tem-se observado que os constituintes majoritários apresentaram melhor atividade sobre determinados micro-organismos do que o próprio óleo essencial (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Estes fatos despertaram interesse, por parte dos pesquisadores, a respeito da participação de cada composto na responsabilidade das atividades antimicrobianas e medicinais como um todo.

O α -terpineol é um dos componentes majoritários do óleo de *M. alternifolia* e é apontado em alguns estudos, como um dos principais responsáveis pela atividade antibacteriana do óleo de *M. alternifolia* (CARSON; RYLEY, 1998; CARSON; RYLEY, 2002; CARSON; HAMMER; RYLEY, 2006). Entre as propriedades desse monoterpeno, pesquisas apontam para o seu potencial antibacteriano, podendo ser incluído na formulação de cremes dentais para o tratamento de periodontite, uma

vez que inibe as bactérias causadoras dessa infecção (PARK et al., 2012). Esse composto também apresenta outras propriedades com potencial terapêutico importante, pois inibe o crescimento de colônias de bactérias causadoras de gastroenterites como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, assim como fungos produtores de toxinas como *Aspergillus flavus*, além de apresentar características anticonvulsivantes, o que demonstra o seu potencial medicinal (SOUSA et al., 2007; BADAWAY et al., 2019).

O carvacrol é um composto monoterpenóide fenólico isolado dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lepidium flavum* e *Citrus aurantium* var. *bergamia* que em temperatura ambiente encontra-se na forma líquida (SHARIFI-RAD, et al., 2017). Segundo a união Internacional de química pura e aplicada esse composto pode ser chamado de 5-isopropil 2-metilfenol (YADAV; KAMBLE, 2009). De acordo com Yadav e Kamble (2009) o carvacrol possui densidade de 0,976g/mL à temperatura ambiente (25°C), suas propriedades lipofílicas são responsáveis pela sua insolubilidade em água, entretanto é altamente solúvel em etanol, acetona e éter dietílico. As propriedades desse composto incluem atividade antibacteriana e antifúngica (CHAVAN; TUPE, 2014; NOSTRO et al., 2012), antiviral (GILLING et al., 2014; Sánchez et al., 2015), anti-*P. insidiosum* (JESUS et al., 2015), antioxidante (GUIMARÃES et al., 2010; MILOS et al., 2012) e anticarcinogênicas (ARUNASREE, 2010; OZKAN; ERDOGAN, 2011; YIN et al., 2012). Suas diversas propriedades medicinais estão tornando esse composto muito visado pela indústria farmacêutica para a produção de insumos terapêuticos para doenças causadas por micro-organismos.

O mentol é um composto fenólico extraído do óleo essencial de *M. piperita*. Esse composto possui propriedades antimicrobianas bastante conhecidas e é apontado como um dos componentes responsáveis pela característica antimicrobiana desse óleo. Suas aplicações são diversas incluindo a inibição de formação de biofilme em *C. albicans* (BENZAID et al., 2019) e ação analgésica e sedativa para manuseio de peixes (SEPULCHRO et al., 2016). Adicionalmente, esse composto pode atuar como antimicrobiano contra bactérias (TURCHENIUK et al., 2015; KIFER et al., 2016) e fungos (ABBAZADEH et al., 2014; MOGHTADER, 2013).

O eugenol é um composto aromático que está presente no óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*. Esse composto possui características antimicrobianas comprovadas sobre bactérias invasoras do trato gastrointestinal como *Salmonella*

sp. *E. coli* e *S. aureus* (DEVI et al, 2010; CHEN et al, 2009). Sua ação antimicrobiana também foi observada sobre fungos de importância na agricultura como *Lenzites betulina* e *Laetiporus sulphureus*, fungos ambientais como *Aspergillus* spp., *Alternaria alternata*, *Botrytis cinerea*, *Cladosporium* spp., *Penicillium* spp., *Fusarium oxysporum* e *Rhizopus oryzae* e dermatófitos (CHAMI et al. 2004; CHENG, 2008; ABBAZADEH et al., 2014) e herpes vírus HSV-1 e 2 (ORHAN, 2009; TRAGOOLPUA; JATISATIENR, 2007).

3.3.3 Nanocompostos

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, via de regra, apresentam diâmetro inferior a 1µm (SCHAFFAZICK; GUTERRES, 2003; REIS et al., 2006; GMORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

Valente et al. (2016a) demonstraram em um ensaio *in vitro* que o óleo essencial de *M. alternifolia* em nanoemulsão apresentou atividade anti-*P. insidiosum* superior ao óleo na sua forma livre e atribuíram esse resultado à melhor estabilidade da nanoemulsão, o que sugere que esse tipo de tecnologia pode vir a melhorar a eficácia de compostos com atividade oomicida.

3.3.3.1 Nanopartículas de prata

Os íons metálicos tais como metais de cobre, prata e mercúrio são utilizados há muito tempo devido às suas propriedades antimicrobianas. Barras de prata eram colocadas em cisternas de água no antigo Egito para o tratamento de úlceras. Alimentos e bebidas também eram armazenados em vasilhas de prata a fim de impedir a sua putrefação (INGLE et al., 2014; LEUNG et al., 2014).

O surgimento de resistência dos micro-organismos aos antimicrobianos e a emergência de novos patógenos tem estimulado a procura por novos compostos

antimicrobianos. Com isso a incorporação de prata em nanopartículas pode ser vista como uma alternativa a ser empregada no desenvolvimento de fármacos antimicrobianos (INGLE et al., 2014; RAI et al., 2009).

Relatos na literatura descrevem nanopartículas de prata (AgNP) com ação letal em bactérias, leveduras, algas e agregados microbianos (CARLSON et al., 2008; FABREGA et al., 2009, 2011). A liberação lenta de prata causa efeitos tóxicos diretamente na membrana citoplasmática do micro-organismo (FABREGA 2009), o que simula a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) (CHOI et al., 2010) e promove a desativação enzimática (FABREGA et al, 2011), levando à inibição do crescimento microbiano, disrupção celular e morte (MIAO et al., 2017).

Diversas metodologias podem ser utilizadas para a síntese de AgNPs, sendo eles: métodos químicos, físicos e biológicos. As nanopartículas de produção biológica são sintetizadas por extratos de plantas e/ou micro-organismos (SIDDIQI et al., 2018). Entre os métodos biológicos os mais utilizados empregam micro-organismos para a produção de nanopartículas metálicas. Esses micro-organismos podem ser: algas, bactérias, fungos e actinomicetos. Além destes, plantas e peptídeos também podem ser utilizados para a síntese dessas nanopartículas (DURÁN et al., 2005). Segundo Siddiqi et al. (2018), as bio-nanopartículas não produzem nenhum subproduto tóxico como os gerados nas nanopartículas sintetizadas pelos métodos químicos, além de ser um método simples, econômico, com alto rendimento e ecologicamente correto.

As propriedades antimicrobianas das AgNP e seu potencial terapêutico impulsionaram diversos estudos, sendo aplicadas em diversas áreas incluindo hospitalar, produção de embalagens de alimentos, purificação de água e produção de cosméticos (ALLAKER; MEMARZADEH, 2014; LI et al., 2008; LOHANI et al., 2014; TAVAKOLI et al., 2017; YU et al., 2019).

Na indústria farmacêutica, as AgNP são empregadas na forma de cremes ou soluções de nitrato de prata, sendo utilizadas na prevenção de queimaduras, feridas e úlceras, como também no tratamento de dermatites atópicas (WU et al., 2014; RUGIDO-SANTOS, et al., 2019).

As AgNPs possuem ação larvicida contra artrópodes vetores da dengue, filariose e malária (GOSH et al., 2012; SUBARANI et al., 2013; Sungaya et al., 2014), bem como apresentam ação antimicrobiana contra bactérias multirresistentes (LEE et al., 2008; LOK et al., 2008; GOYAL et al., 2018), fungos patógenos

- 1 (NASROLLAHI et al., 2011; XU et al., 2013; RADHALRISHNAN 2018; BOCATE et
- 2 al., 2019) e vírus (LARA et al., 2010; ZODROW et al., 2018; SZYMAŃSKA et al.,
- 3 2018).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

***In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles**

Júlia de Souza Silveira Valente; Caroline Quintana Braga; Carolina Litchina Brasil;
Cristiane Telles Baptista; Guilherme Fonseca Reis; Luciano Aparecido Panagio;
Gerson Nakazato; Silvia de Oliveira Hübner; Mauro Pereira Soares; Sônia de Avila
Botton; Daniela Isabel Brayer Pereira

Artigo publicado na revista Medical Mycology, 2018, 0, 1–6
doi: 10.1093/mmy/myy147

For reference only – do not apply corrections to this file



Original Article

In vitro anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles

21 5 **Júlia de Souza Silveira Valente¹, Caroline Quintana Braga¹,
Carolina Litchina Brasil¹, Cristiane Telles Baptista¹, Guilherme Fonseca Reis²,
Luciano Aparecido Panagio², Gerson Nakazato², Sílvia de Oliveira Hübner³,
Mauro Pereira Soares⁴, Sônia de Avila Botton⁵
and Daniela Isabel Brayer Pereira^{1,*}**

10 ¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil,
²Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil, ³Laboratório de
Virologia e Imunologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, ⁴Laboratório Regional de Di-
agnóstico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil and ⁵Departamento de Medicina Veterinária Pre-
ventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

15 *To whom correspondence should be addressed: Dr. Daniela Isabel Brayer Pereira, Universidade Federal de Pelotas, Instituto de
Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário Capão do Leão, s/n°. CEP:
96160-000. Tel: +55 53 32757338; Fax: +55 53 32757338; E-mail: danielabrayer@gmail.com

Received 24 September 2018; Revised 22 November 2018; Accepted 29 November 2018; Editorial Decision 28 November 2018

Abstract

20 *Pythium insidiosum* belongs to the phylum Oomycota. It is capable of infecting mammals causing a serious
condition called pythiosis, which affects mainly horses in Brazil and humans in Thailand. The objective of the
present study was to verify the *in vitro* anti-*P. insidiosum* activity of a biogenic silver nanoparticle (bio-AgNP)
formulation. The *in vitro* assays were evaluated on *P. insidiosum* isolates ($n = 38$) following the M38-A2
25 protocol. Damage to the *P. insidiosum* hyphae ultrastructure was verified by means of scanning electron
microscopy (SEM) and transmission electron microscopy (TEM). Bio-AgNP inhibition concentrations on *P.*
insidiosum isolates ranged from 0.06 to 0.47 $\mu\text{g/ml}$. It was observed through SEM that *P. insidiosum* hyphae
treated showed surface roughness, as well as cell walls with multiple retraction areas, loss of continuity,
and rupture in some areas. The TEM of treated hyphae did not differentiate organelle structures; also,
30 the cellular wall was rarefied, showing wrinkled and partly ruptured borders. The bio-AgNP evaluated has
excellent *in vitro* anti-*P. insidiosum* activity. However, further studies on its *in vivo* action are necessary as
so to determine the possibility of its use in the treatment of the disease in affected hosts.

Key words: pythiosis, Oomycota, antimicrobial, susceptibility, metal compounds.

Introduction

35 *Pythium insidiosum* belongs to the phylum Oomycota, which in-
cludes several genera, such as *Pythium*, *Phytophthora*, *Hyaloper-
onospora*, *Albugo*, *Saprolegnia*, and *Aphanomyces*. Among
these genera, *Pythium* spp. is capable of infecting mammals,
causing a serious condition called pythiosis, which affects mainly
40 horses in Brazil and humans in Thailand.^{1,2} *Pythium insidiosum*

lacks ergosterol in its plasma membrane. This fact largely justi-
fies failures in the disease treatment with conventional antifungal
drugs, particularly azoles and amphotericin B.^{2,3} The therapeu-
tic inefficacy of pythiosis in animals often leads to the death of
45 affected individuals.^{2,4}

The search for new effective compounds to fight *P. insidio-
sum* has led to studies which have used active principles differ-
ent from those of conventional antifungals.^{5–13} Recent studies

evaluating the anti-*P. insidiosum* activity of protein synthesis inhibitors, notably minocycline and azithromycin, have demonstrated that these drugs have *in vitro* and *in vivo* action on *P. insidiosum*,^{12,13,14} as well as being effective in the treatment of ocular pythiosis in humans.^{15–17}

According to Ribeiro et al.,⁸ the use of metal compound complexes against antimicrobial agents may be a favorable alternative for the treatment of diseases caused by resistant microorganisms. Also, research involving new technologies should be evaluated in order to improve the disease therapeutics. In this sense, Valente et al.⁹ have demonstrated the antimicrobial potential of a *Melaleuca alternifolia* nanoemulsion on *P. insidiosum*.

Silver nanoparticles (AgNP) are compounds that show high therapeutic potential. Several studies have demonstrated their antimicrobial properties, including activity on multiresistant bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*,^{18–20} as well as fungi that are difficult to eliminate, such as *Candida albicans* and agents of ophthalmic diseases, such as *Aspergillus* spp. and *Alternaria alternata*,^{21–23} also to viruses (human herpes virus and human immunodeficiency virus).^{24–26}

Several methodologies can be used for the synthesis of AgNP, whether chemical, physical, and biological. Biologically produced nanoparticles are synthesized by plant extracts and/or microorganisms.²⁷ Among the most widely used biological methods, microorganisms (algae, bacteria, fungi, and actinomycetes) can be used to produce metal nanoparticles.²⁸ According to Siddiqi et al.,²⁷ bio nanoparticles do not produce any toxic by-products as the ones generated by those synthesized by chemical methods; besides, this is a simple, economical, high-yielding and ecofriendly method.

Therefore, the objective of the present study was to verify the *in vitro* anti-*P. insidiosum* activity of a biogenic silver nanoparticle (bio-AgNP) formulation.

Methods

P. insidiosum isolates

In the present study, *P. insidiosum* clinical isolates ($n = 29$), a standard equine strain (CBS101555), and eight standard strains of human origin (CBS57585, CBS57685, CBS67385, CBS70283, CBS77784, CBS119453, CBS119454, CBS119455) were used.

Biogenic silver nanoparticles (bio-AgNP)

Bio-AgNP was formulated by the method previously described and patented by Durán et al.,^{28,29} and adapted. The method consisted in the reduction of silver nitrate by *Fusarium oxysporum* strain 551 at the Laboratory of Molecular Genetics from ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brazil). This fungus was cultured in 90-mm Petri dishes in medium containing 0.5% yeast extract (Himedia, Mumbai, India), 3% malt extract (Acumedia, Michigan, USA), and 1.5% agar (Kasvi, Italy) at 28°C for

7 days. After growth, the fungal biomass was separated from the culture medium, and sterile distilled water 0.1 g mycelium for each 1 ml) was added; it was then incubated in an orbital shaker at 28°C at 150 rpm/72 hours. Subsequently, the solution components were fractionated by filtration and centrifugation for 5 min. at 1860 g. The supernatant was mixed with 10 mM AgNO₃ (Sigma Aldrich, St Louis, USA) and incubated at 28°C for 10 days. AgNP aliquots were measured by absorbance at 440 nm in a UV-Vis (Varian Cary 50 Probe) spectrophotometer. The bio-AgNP diameter and zeta potential measurement were determined by photon correlation spectroscopy using ZetaSizer Nano ZS. The Zeta potential (mV) of the bio-AgNP used in this study was –32.9, and the size was 100 nm.

In vitro susceptibility tests

Susceptibility tests followed the protocol described by document M38-A2³⁰ with modifications to oomycetes. The inoculum used in the tests consisted of a hyphae suspension prepared as described by Fonseca et al.³¹ Briefly, a suspension of the inoculum was obtained from the *P. insidiosum* culture on 0.1% yeast agar incubated at 37°C for 96 hours. After that, the culture was hydrated with 10 ml sterile distilled water and the mycelium scraped with the aid of a sterilized scalpel blade. The obtained solution was transferred to a tube and the inoculum was adjusted to a transmittance of 80%–85% at 530 nm. In order to perform the susceptibility tests, the inoculum was previously diluted at 1:10 in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 glucose medium and buffered at pH 7.0 with 0.165 M MOPS. The bio-AgNP was diluted in RPMI medium and the concentrations tested ranged from 0.0075 to 3.76 µg/ml. Positive control of *P. insidiosum* growth consisted of RPMI and inoculum and negative control of RPMI and bio-AgNP. Plates were incubated at 37°C in an orbital shaker under constant stirring for 48 hours. The reading was visual and took the presence or absence of hyphae growth into consideration. The lowest bio-AgNP concentration capable of inhibiting *P. insidiosum* growth was identified as the minimum inhibitory concentration (MIC). Concentrations above the MIC were used to determine the minimum oomicidal concentration (MOC). For this, 100 µl of the dilution was transferred to tubes containing 900 µl Sabouraud broth, which were incubated at 37°C for 48 hours. The MOC was the lowest bio-AgNP concentration that did not show growth. The tests were performed in quadruplicate.

Scanning electron microscopy (SEM)

Sample preparation was performed according to Bona et al.,³² adapted for oomycetes. In short, after performing the *in vitro* susceptibility test, *P. insidiosum* (CBS 101555) hyphae from a sublethal concentration (bio-AgNP concentration where there was hyphal growth immediately after MIC) in the susceptibility

test (0.12 $\mu\text{g/ml}$) and hyphal growth control (without treatment) were fixed in 1 ml glutaraldehyde (2.5%) and kept at 4°C/48 hours. Later, the hyphae were washed in sterile distilled water (dH₂O) and drained for microscope cover slips, which received 20 second baths (20 μl) with increasing concentrations of ethanol (30, 50, 70, and 95%). Next, the hyphae were submitted to a 100% ethanol bath and dried in an oven at 37°C/24 h. After drying, the samples were transferred to stubs and covered with gold-palladium (60 s, 1.8 mM, 2.4 kv), being visualized at 25 kv at a 400 to 4300 $\times$ magnitude.

Transmission electron microscopy (TEM)

The standard CBS 101555 strain was used for electron microscopy analysis. Hyphae grown at a sublethal concentration (0.12 $\mu\text{g/ml}$) were selected from the *in vitro* susceptibility test. As TEM control, *P. insidiosum* hyphae were used without treatment. The preparation protocol followed the one described by Bona et al.,³² adapted. Briefly, the hyphae were drained from the culture medium, fixed in 1 ml glutaraldehyde (2%), and kept at 4°C overnight. Then the hyphae were washed twice with dH₂O and three times with a sodium cacodylate (0.1 M), sucrose (0.2 M) buffer, pH 7.4. The obtained hyphae pellets were resuspended in potassium permanganate (2%) and kept for 1 hour at 4°C. The samples were then washed with dH₂O and resuspended in osmium and sodium cacodylate buffer (0.4 M, pH 7.4) for 50 min. Afterward, the pellets were washed with dH₂O and subjected to successive baths of increasing concentrations of alcohol (50, 70, and 90%) for 5 min each bath. Subsequently, the samples were subjected to three alcohol baths (100%) for 10 min, followed by two acetone washes for 10 min. The pellets were subjected to a bath in a 1 ml acetone and 1 ml resin solution. The samples were then added to resin and kept at constant stirring for one hour. Ultrafine 60 nm and semifine (1 μ) cuts were made in Leica Ultracut UCT cacodylate buffer, and TEM generated images were observed under a Philips CM 10 microscope.

Cytotoxicity assay

Bio-AgNP cytotoxicity was analyzed in RK13 (rabbit renal cell - ATCC® CCL-37™) line from the cell bank of the Laboratory of Virology and Immunology of the School of Veterinary Medicine,

Federal University of Pelotas. We chose to carry out the assay in RK13 cell line, since these cells are originated from rabbits that are the experimental model for studying pythiosis. For the assay, RK13 cells were cultured (3×10^4 cells/well) in E-MEM (eagle minimum essential media) supplemented with 10% FBS (fetal bovine serum) in 96-well microplates. After 24 hours in a bacteriological incubator at 37°C with 5% CO₂ and approximately 90% confluence, the medium was drained, and bio-AgNP was added at 5 to 0.04 $\mu\text{g/ml}$ concentrations in E-MEM. Control cells were kept only in E-MEM. After incubation for 24 or 48 hours under the same conditions, the MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) reduction test was performed to determine cell viability, according to Mosmann.³³ In short, MTT (0.5 mg/ml in PBS; 50 μl /well) was added after the specified time and the plates were incubated at 37°C for 4 hours. After removal of the cell supernatant, the crystals were solubilized by the addition of DMSO (Dimethyl sulfoxide, 100 μl /well) and shaken. The absorbance was determined at a 570 nm wavelength.

Results

In vitro susceptibility tests

Bio-AgNP inhibition concentrations on *P. insidiosum* isolates ranged from 0.06 to 0.47 $\mu\text{g/ml}$ (Table 1). MIC₅₀ (minimum inhibitory concentration capable of inhibiting 50% of isolates) was 0.24 $\mu\text{g/ml}$, and MIC₉₀ (minimum inhibitory concentration capable of inhibiting 90% of isolates) was 0.47 $\mu\text{g/ml}$. MOC were the same as MIC in all isolates evaluated.

Scanning electron microscopy (SEM)

Images of *P. insidiosum* (CBS 101555) hyphae treated and untreated with bio-AgNP obtained in SEM are shown in Fig. 1. Oomycete hyphae not treated with bio-AgNP showed a turgid appearance, with a smooth and homogeneous surface (Fig. 1a). On the other hand, the bio-AgNP treated isolate showed hyphae with rough surfaces and areas with increased electro-density, as well as multiretracted cell walls, loss of continuity, and the presence of desquamation and disruption areas (Fig. 1b, 1c, 1d).

Table 1. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* (n = 38) to bio-AgNP formulation.

No. of isolates (%) with the indicated MIC ¹ ($\mu\text{g/ml}$)				MIC ₅₀ ²	MIC ₉₀ ³	MIC range ($\mu\text{g/ml}$)	GM MIC ($\mu\text{g/ml}$)
0.06	0.12	0.24	0.47				
08 (21)	06 (15.8)	20 (52.6)	4 (10.6)	0.24	0.47	0.06–0.47	0.17

¹Minimum inhibitory concentration (100% growth inhibition).

²Minimal concentration to inhibit the growth of 50% of isolates.

³Minimal concentration to inhibit the growth of 90% of isolates. GM, geometric mean.

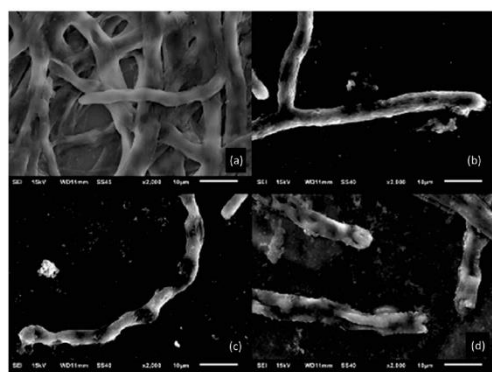


Figure 1. *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 101555) visualized in SEM. (A) Control sample (untreated). Coenocytic hyphae with turgid appearance showing a smooth and homogeneous surface. (B) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Hyphae showing surface roughness and areas with increased electron density. (C) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Hypha showing multiple areas with retraction and loss of continuity of cell wall interspersed with areas of electron density increase. (D) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Hyphae are retracted and the cell wall is desquamated and ruptured in some areas.

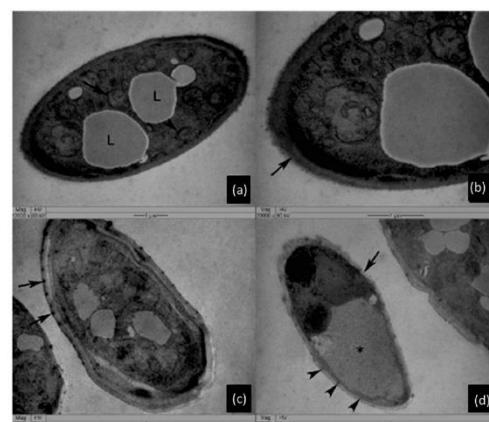


Figure 2. *Pythium insidiosum* ultrastructure (CBS 101555) visualized in TEM. (A) Control sample (untreated). Cytoplasm exhibiting mitochondria (arrow), lipid (L) and Golgi apparatus (arrowhead). (B) Control sample (untreated). Cell wall thick and homogeneous (arrow). (C) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. The cell wall is weakly impregnated by osmium and with multiple electron-dense areas (arrow). Intracytoplasmic elements are homogeneous and the organelle structure is not differentiated. (D) Sample treated with 0.12 µg/ml bio-AgNP. Thinned wall with wrinkled edges (arrow) and electron dense areas (arrowhead) can also be found. The upper region the cell wall is rough and partially ruptured. Intracytoplasmic organelles have disappeared, remaining only some homogeneous-looking material (*).

Transmission electron microscopy (TEM)

P. insidiosum (CBS 101555) ultrastructure (Fig. 2) could be observed in TEM. In the control sample (untreated), the presence of a thick cell wall with homogeneous appearance was evidenced; it was also possible to visualize intracytoplasmic organelles (Fig. 2a, 2b). When *P. insidiosum* hyphae were treated with bio-AgNP, the cell wall was observed to be weakly impregnated by osmium, showing multiple electron dense areas. Also, intracytoplasmic elements were homogeneous, and it was not possible to differentiate organelle structures; also, the cell wall was rarefied, with wrinkled and partially ruptured borders (Fig. 2c, 2d).

Cytotoxicity assays

The 24-hour reading showed a bio-AgNP toxicity threshold on RK13 cells at concentrations of 0.6 to 5 µg/ml (maximum concentration tested). The cytotoxic concentration was at 0.3 µg/ml for 90% of the cell cultures (CC₉₀). At 48 hours, the cytotoxicity threshold ranged from 0.3 to 5 µg/ml, with CC₅₀ and CC₉₀ being evidenced at a 0.3 µg/ml concentration.

Discussion

Pythiosis is thought to be an emerging disease that affects mainly humans and horses, and is responsible for high morbidity and mortality rates in endemic regions.³⁴ The medical therapy of the disease is highly variable, and conventional treatments most often fail. Due to the complexity of the treatment of this relevant disease, some studies have been carried out to evaluate the *in*

vitro and *in vivo* susceptibility of *P. insidiosum* to different drugs and natural compounds with widely variable results.^{5–11,13,35–36}

Studies have demonstrated the high AgNP antimicrobial potential, having been applied in several areas, including hospitals, food, water purification, and cosmetic production.^{37–40} Additionally, AgNP are used by the pharmaceutical industry as creams or silver nitrate solutions in the treatment of burns, wounds and ulcers.⁴¹ Their larvicidal action against arthropod vectors of dengue fever, filariasis and malaria,^{42–44} as well as their antimicrobial action against multiresistant bacteria,^{18–20} pathogenic fungi,^{21–23} and viruses^{24–26} is also worth mentioning.

The susceptibility tests using bio-AgNP applied in the present study showed MIC ranging from 0.06 to 0.47 µg/ml, which demonstrated their antimicrobial potential against this pathogen. These results are in agreement with those of Xu et al.²² who, upon testing AgNP against fungi causing ocular keratitis, found very similar MIC (0.0625–1.0 µg/ml) for several *Aspergillus* and *Alternaria alternata* species.

On the other hand, *P. insidiosum* MIC values in this study were much lower than those reported by Nasrollahi et al.²¹ for *C. albicans* (500–2000 µg/ml) and *Saccharomyces cerevisiae* (4000–32 000 µg/ml). Likewise, Radhakrishnan et al.²³ found MIC ranging from 5 to 40 µg/ml upon testing AgNP against *C. albicans* resistant strains.

Ribeiro et al.⁸ evaluated metal compounds containing cadmium, lead, copper, manganese, and zinc on *P. insidiosum* isolates, having demonstrated better anti-*P. insidiosum* activity with copper and cadmium compounds. However, the study did not

evaluate the activity of silver-containing compounds.
A previous study carried out by our research group demonstrated that nanoemulsions were capable of improving the efficacy of *Melaleuca alternifolia* essential oil by reducing MIC against *P. insidiosum* isolates,⁹ thus showing that nanostructured compounds can be used to increase antimicrobial activity.

Radhakrishnan et al.,²³ upon using AgNP on *C. albicans* cells, showed through SEM that untreated cells had a smooth surface, whereas treated ones presented different surface alterations and rough cell walls. Through TEM, the same authors reported wall and cell membrane integrity impairment when assessing AgNP on *C. albicans*, suggesting that these alterations may have occurred due to cell damage in these structures. In the present study, similar effects were observed on the *P. insidiosum* ultrastructure. Interestingly, intracytoplasmic changes of the cell of this oomycete were evidenced by TEM.

According to Nasrollahi et al.,²¹ silver nanocompounds act on the fungal cell membrane causing pore openings that compromise the membrane potential, leading to the microorganism death by apoptosis. Additionally, Radhakrishnan et al.²³ suggested that the AgNP antifungal activity is related to apoptosis induction due to mitochondrial dysfunction associated an increased oxidative stress through the generation of reactive oxygen species (ROS), especially hydroxyl radicals. These authors have demonstrated that AgNP induces intracellular ROS formation, suggesting that the latter may contribute to AgNP-induced antifungal effect.

Kaba and Egorova⁴⁵ found that AgNP toxicity thresholds ranged from 0.5 to 2 µg/ml when tested in tumor cell lines within 24 hours. Similarly, the cytotoxicity assay performed in the present study evidenced a cytotoxicity threshold between 0.6 and 5 µg/ml within 24 hours on rabbit cell lines. Based on the results obtained, it may be suggested that bio-AgNP concentrations showing anti-*P. insidiosum* activity do not pose a toxicity risk to mammalian cells. However, further studies are needed to evaluate this hypothesis. According to Nasrollahi et al.,²¹ the fact that AgNP inhibitory concentrations on fungi are low prevents them from causing toxic effects to host cells.

The present study is a landmark in the evaluation of bio-AgNP on *P. insidiosum* isolates and demonstrates the *in vitro* activity on this important pathogenic mammalian oomycete. It is expected that from this research, prospects for the development of new antimicrobial drugs for pythiosis control be broadened.

The bio-AgNP-containing compound evaluated in this study showed excellent *in vitro* anti-*P. insidiosum* activity. However, future studies on its *in vivo* action are essential to determine its possibility of use in the treatment of the disease in affected hosts.

Acknowledgments

This work was supported through resources provided by Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq - Grant number: 442020/2014-7 to D.I.B.P) and the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES Finance Code 001).

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Fletcher KIG, van West P, Gachon CMM. Nonagonal cadherins: a new protein family found within the Stramenopiles. *Gene*. 2016; 59: 64–75.
- Gaastra W, Lipman LJ, De Cock AW et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol*. 2010; 146: 1–16.
- Hilton RE, Tepedino K, Glenn CJ et al. Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. *Br J Dermatol*. 2016; 175: 394–397.
- Mendoza L, Vilela R. The mammalian pathogenic Oomycetes. *Curr Fungal Infect Rep*. 2013; 7: 198–208.
- Zanette RA, Alves SH, Pilotto MB et al. Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 1144–1147.
- Zanette RA, Jesus FPK, Pilotto MB et al. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. *J Mycol Med*. 2015; 25: 91–94.
- Araújo MJ, Bosco SM, Sforzin JM. *Pythium insidiosum* inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. *Braz J Microbiol*. 2016; 47: 863–869.
- Ribeiro TC, Weiblen C, Botton SA et al. *In vitro* susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc. *Med Mycol*. 2017; 55: 669–672.
- Valente JSS, Fonseca AOS, Brasil CL et al. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in its free oil and nanoemulsion formulations against *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia*. 2016; 181: 865–869.
- Valente JSS, Fonseca AOS, Denardi LB et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. *Mycopathologia*. 2016; 181: 617–622.
- Trolezi R, Azanha JM, Paschoal NR et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017; 1: 1–7.
- 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*. 2012; 156: 222–226.
- Loreto ES, Tondolo JSM, Oliveira DC, Santurio JM, Alves SH. *In vitro* activities of Miltefosine and antibacterial agents from the Macrolide, Oxazolidinone, and Pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62: 1678–1687.
- Jesus FP, Loreto ES, 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*. 2016; 60: 87–91.
- Ramappa M, Nagpal R, Sharma S, Chaurasia S. Successful medical management of presumptive *Pythium insidiosum* keratitis. *Cornea*. 2017; 36: 511–514.
- Chatterjee S, Agrawal D. Azithromycin in the management of *Pythium insidiosum* keratitis. *Cornea*. 2018; 37: e8–e9.
- Bagga B, Sharma S, Guda SJ et al. Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2018; 102: 1629–1633.
- Lee BU, Yun SH, Ji JH, Bae GN. Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne silver nanoparticles. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18: 176–182.

19. Lok CN, Ho CM, Chen R, Tam PK, Chiu JF, Che CM. Proteomic identification of the Cus system as a major determinant of constitutive *Escherichia coli* silver resistance of chromosomal origin. *J Proteome Res.* 2008; 7: 2351–2356.
20. Goyal S, Gupta N, Kumar A, Chatterjee S, Nimesh S. Antibacterial, anticancer, and antioxidant potential of silver nanoparticles engineered using *Trigonella foenum-graecum* seed extract. *IET Nanobiotechnol.* 2018; 4: 526–533.
21. Nasrollahi A, PourshamsianKh Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *Int J Nano Dimens.* 2011; 1: 233–239.
22. Xu Y, Gao C, Li X et al. *In vitro* antifungal activity of silver nanoparticles against ocular pathogenic filamentous fungi. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2013; 29: 270–274.
23. Radhakrishnan VS, Reddy Mudiam MK, Kumar M, Dwivedi SP, Singh SP, Prasad T. Silver nanoparticles induced alterations cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). *Int J Nanomedicine.* 2018; 13: 2647–2663.
24. Zodrow K, Brunet L, Mahendra S et al. Polysulfone ultrafiltration membranes impregnated with silver nanoparticles show improved biofouling resistance and virus removal. *Water Res.* 2009; 43: 715–723.
25. Lara HH, Ayala-Núñez NV, Ixtapan-Turrent L, Rodríguez-Padilha C. Mode of antiviral action of silver nanoparticles against HIV-1. *J Nanobiotechnology.* 2010; 20: 1–10.
26. Szymańska E, Orłowski P, Winnicka K et al. Multifunctional tannic acid/silver nanoparticle-based mucoadhesive Hhydrogel for improved local treatment of HSV infection: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Mol Sci.* 2018; 19: 1–21.
27. Siddiqi KS, Husen A, Rao RAK. A review on biosynthesis of silver nanoparticles and their biocidal properties. *J Nanobiotechnology.* 2018; 16: 1–28.
28. Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GI, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnology.* 2005; 3: 1–7.
29. Durán N, Alves OL, Esposito E, de Souza G, de Souza GI, Marcato PD. 2006. Processo de produção de nanopartículas de prata estabilizadas por proteínas na produção de produtos têxteis antibacterianos e o tratamento dos efluentes produzidos. Braz. patent PI 0605681–4 A. Campinas; BR, Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI).
30. Clinical Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi.* 2002. Wayne, PA: Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards.
31. Fonseca AOS, Pereira DIB, Maia Filho FS et al. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. *J Antimicrob Chemother.* 2014; 69: 1564–1567.
32. Bona E, Cantamessa S, Pavan M et al. Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? *J Appl Microbiol.* 2016; 12: 1530–1545.
33. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 1983; 65: 55–53.
34. Hilton RE, Tepedino K, Glenn CJ, Merkel KL. Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. *Br J Dermatol.* 2016; 175: 394–397.
35. Fonseca AO, Pereira DI, Botton AS et al. Treatment of experimental pythiosis with essential oils of *Origanum vulgare* and *Menthapiperita* singly, in association and in combination with immunotherapy. *Vet Microbiol.* 2015; 178: 265–269.
36. Valente JSS, Fonseca AOS, Denardi LB et al. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. *J Appl Microbiol.* 2016; 4: 998–1003.
37. Allaker RP, Memarzadeh K. Nanoparticles and the control of oral infections. *Int J Antimicrob Agents.* 2014; 43: 95–104.
38. Li Q, Mahendra S, Lyon DY et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. *Water Res.* 2008; 42: 4591–4602.
39. Lohani A, Verma A, Joshi H, Yadav N, Karki N. Nanotechnology-based cosmetics. *ISRN Dermatol.* 2014; 22: 1–14.
40. Tavakoli H, Rastegar H, Taherian M, Samadi H, Rostami H. The effect of nano-silver packaging in increasing the shelf life of nuts: an *in vitro* model. *Ital J Food Saf.* 2017; 7: 156–161.
41. Wu J, Zheng Y, Song W et al. *In situ* synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydr Polym.* 2014; 15: 762–771.
42. Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res.* 2012; 135: 581–598.
43. Subarani S, Sabhanayakam S, Kamaraj C. Studies on the impact of biosynthesized silver nanoparticles (AgNPs) in relation to malaria and filariasis vector control against *Anopheles stephensi* Liston and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *Parasitol Res.* 2013; 112: 487–499.
44. Suganya G, Karthi S, Shivakumar MS. Larvicidal potential of silver nanoparticles synthesized from *Leucas aspera* leaf extracts against dengue vector *Aedes aegypti*. *Parasitol Res.* 2014; 113: 1673–1679.
45. Kaba SI, Egorova EM. *In vitro* studies of the toxic effects of silver nanoparticles on HeLa and U937 cells. *Nanotechnol Sci Appl.* 2015; 8: 18–29.

4.2 Artigo 2

Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy

Júlia de Souza Silveira Valente; Carolina Litchina Brasil; Caroline Quintana Braga; Rosimeri Zamboni; Elisa Simone Viégas Sallis; Ana Paula Neuschrack Albano; Cristina Gomes Zambrano; Helen Cabaldi Franz; Luciana Pötter; Luciano Aparecido Panagio; Guilherme Fonseca Reis; Sônia de Avila Botton; Daniela Isabel Brayer Pereira

Artigo publicado na revista Medical Mycology, 2020, 0, 1–6
doi:10.1093/mmy/myz141



Original Article

Biogenic silver nanoparticles in the treatment of experimental pythiosis Bio-AgNP in pythiosis therapy

Júlia de Souza Silveira Valente¹, Carolina Litchina Brasil¹,
Caroline Quintana Braga¹, Rosimeri Zamboni², Elisa Simone Viégas Sallis²,
Ana Paula Neuschrank Albano³, Cristina Gomes Zambrano¹,
Helen Cabaldi Franz⁴, Luciana Pötter⁵, Luciano Aparecido Panagio⁶,
Guilherme Fonseca Reis⁶, Sônia de Avila Botton⁷ and Daniela Isabel Brayer Pereira^{1,*}

¹Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, ²Laboratório Regional de Diagnóstico, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, ³Hospital de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, ⁴Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brazil, ⁵Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Santa Maria, RS, Brazil, ⁶Departamento de Microbiologia, Universidade Estadual de Londrina, Londrina, PR, Brazil and ⁷Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil

*To whom correspondence should be addressed. Dr. Daniela Isabel Brayer Pereira, Universidade Federal de Pelotas, Instituto de Biologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Prédio 18, Sala 14. Campus Universitário Capão do Leão, s/n°. CEP: 96160-000. Tel: +55 53 32757338; Fax: +55 53 32757338; E-mail: danielabrayer@gmail.com.

Received 31 October 2019; Revised 18 December 2019; Accepted 31 December 2019; Editorial Decision 26 December 2019

Abstract

Pythiosis is a rapidly progressing disease that can be lethal to affected individuals due to resistance to available therapeutic protocols. The disease affects mammals, with the largest number of reports in horses and humans. The present study investigated the activity of biogenic silver nanoparticles (bio-AgNP) in the treatment of experimental pythiosis. The disease was reproduced in nine female 90-day-old New Zealand rabbits. Animals were divided into three groups: group1 (control, $n = 3$) daily and topically treated with a nonionized gel-based formulation and 1 ml of sterile distilled water intralesion administered every 48 hours; group 2 ($n = 3$), daily and topically treated with gel-based formulation containing 1 $\mu\text{g/ml}$ bio-AgNP; group 3 ($n = 3$), treated with 1 ml bio-AgNP in 1 $\mu\text{g/ml}$ aqueous solution intralesion administered every 48 hours. Animals were treated for 45 days, and the area of subcutaneous lesions was measured every 5 days. Results showed that groups 2 and 3 differed from control group ($P < .05$) in the lesion area, as well as the amount of hyphae within the lesions. It was observed that lesions of treated animals (groups 2 and 3) did not differ from each other, showing that the application route did not influence the regression of lesions. However, it was observed that one animal from group 2 reached clinical cure at 35 days of treatment. This research is pioneer in the application of nanocomposites for the treatment of experimental pythiosis and showed that bio-AgNP can be powerful allies of integrative medicine and can be included in pythiosis therapeutic protocols.

Key words: nanocomposites, therapy, rabbits, oomycetes, *Pythium insidiosum*.

Introduction

Pythiosis is a rapidly progressing disease that can be lethal to affected individuals due to resistance to available therapeutic pro-

ocols.^{1,2} It affects mainly horses, with Brazil being the country with the highest number of cases of this disease,³ and humans, with high infection rates in Thailand.² Its etiological agent,

Pythium insidiosum, belongs to the Kingdom Straminipila, Class Peronosporomycetes (Oomycota), Order Pythiales, and Family Pythiaceae, phylogenetically distancing themselves from the true fungi and approaching diatom algae.⁴ Oomycetes are metabolically characterized by their need to incorporate exogenous sterols into their structure to perform physiological functions. Thus, these microorganisms are resistant to antifungal treatments acting on membrane sterols.⁵

Individuals become infected when they come into contact with infecting zoospores present in limnic cycle aquatic environments.¹ The severity of the disease and the difficulties found in treating pythiosis encourage studies aimed at expanding the arsenal of antimicrobial compounds with anti-*Pythium* activity, including research on antibacterial compounds and iron chelators,^{6–8} natural compounds^{9–12} and metallic compounds.^{13,14}

Silver nanoparticles have antimicrobial activity and are used for various purposes, including food packaging,¹⁵ formulation of creams for the treatment of atopic dermatitis,¹⁶ formulation of antimicrobials with antifungal,¹⁷ antibacterial,¹⁸ antiviral,¹⁹ and oomycidal activities.¹⁴

Recently, Valente et al.¹⁴ evaluated the *in vitro* susceptibility of Brazilian *P. insidiosum* isolates to biogenic silver nanoparticles (bioAgNP) and demonstrated that low concentrations of these molecules are capable of causing damage to oomycete cells, causing cell death. Given the oomycidal activity of bioAgNP and the need for effective treatments for pythiosis, the present study aimed to evaluate the therapeutic potential of these molecules in experimental pythiosis.

Methods

Biogenic silver nanoparticles (bio-AgNP)

Bio-AgNP was formulated according to the method previously described and patented by Durán et al.,^{20,21} with modifications. Briefly, the method consists in the reduction of silver nitrate by *Fusarium oxysporum*, strain 551 from the Laboratory of Molecular Genetics - ESALQ-USP (Piracicaba, São Paulo, Brazil). The fungus was grown in 90 mm Petri dishes in 0.5% yeast extract medium, 3% malt extract, 1.5% agar at 28°C for seven days. After growth, the fungal biomass was separated from the culture medium, added sterile distilled water at ratio of 0.1 g of mycelium each 1 ml, and incubated in orbital shaker at 28°C at 150 rpm for 72 hours. Subsequently, solution components were fractionated by filtration and centrifuged for 5 minutes at 1860 g. The supernatant was mixed with 10 mM AgNO₃ and incubated at 28°C for 240 hours. AgNP aliquots were measured by absorbance at 440 nm in a UV-Vis spectrophotometer (VarianCary 50 Probe). Bio-AgNP diameter and zeta potential measurement were determined by photon correlation spectroscopy using ZetaSizerNanoZS. The Zeta potential (mV) of bio-AgNP used in this study was –32.9 and 100 nm in size. For topical treatment of pythiosis lesions, a nonionic-based gel containing

1 µg/ml bioAgNP was formulated. For intralesion treatment, an aqueous solution containing 1 µg/ml bioAgNP was prepared.

Experimental reproduction and pythiosis treatment

For experimental reproduction of the disease, nine 90-day-old female New Zealand rabbits were subcutaneously inoculated in the right dorsal region with 1 ml of induction medium containing approximately 32500 *P. insidiosum* viable zoospores, produced as described by Pereira et al.²² Animals were kept in individual cages in the experimental room at the Central Animal Facility of the Universidade Federal de Pelotas, under adequate hygiene, light, and temperature conditions, receiving water *ad libitum* and feed according to body weight. Before reproduction of disease, skin thickness was measured with the aid of a digital caliper, which was considered to be the skin measurement of the healthy animal. Animals were daily inspected for lesion growth. After the development of subcutaneous nodules (25 days after *P. insidiosum* inoculation), trichotomy was performed in the lesion region and animals were randomly divided into three groups: group1 (control, *n* = 3) daily treated with 5 g of a nonionic-based gel formulation and administration of 1 ml of intralesion sterile distilled water every 48 hours; group 2 (*n* = 3) daily treated with 5 g of a gel-based formulation containing 1 µg/ml bioAgNP; group 3 (*n* = 3) treated with 1 ml bio-AgNP in 1 µg/ml aqueous solution, administered intralesion every 48 hours. A nonionic-based gel formulation was applied on the lesion surface and circular finger movements were performed until the gel was fully absorbed. In intralesion route, 1 ml of sterile distilled water or bio-AgNP in 1 µg/ml aqueous solution was administered into the lesion with the aid of a BD Ultra-Fine™ insulin syringe. Throughout the experiment, the clinical condition of animals was followed, with subcutaneous lesions daily inspected and measured every 5 days. After 45 days of treatment, animals were euthanized following standard protocols. Fragments representing subcutaneous and organ lesions (lung, liver, spleen, kidneys) were collected and fixed in 10% formalin solution, routinely processed for histopathological analysis and stained with Hematoxylin-Eosin (HE) and Methenamine Silver (Grocott). For lesion hyphae quantification, 10 microscopic fields were randomly selected and Grocott silver-stained hyphae were counted. All animal procedures were submitted and approved by the Committee for Animal Experimentation and Ethics of Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Hematological and biochemical profile

Blood samples were collected from animals before procedures and every 15 days until the end of the experiment. Erythrogram and leukogram were performed in a Poch - 100iVDiff® 5 automatic hematological equipment. Morphological analysis of red blood cells and leukocyte differential were performed by microscopic observation of properly stained blood

Table 1. Regression equations for the lesions' dimensions in each of the evaluation days for each group of rabbits inoculated experimentally with zoospores of *Pythium insidiosum* and treated with bio-AgNP.

Treatment	Equation	R ²	P
Group 1 (control)	$\hat{Y} = 27.91 + 0.987x$	96.94%	<.0001
Group 2 (bio-AgNP topical)	$\hat{Y} = 33.05 - 1.61x + 0.101x^2 - 0.0017x^3$	99.36%	<.0001
Group 3 (bio-AgNP intralesion)	$\hat{Y} = 55.48 - 2.698x + 0.049x^2$	92.34%	.0002

Bio-AgNP, biogenic silver nanoparticles.

smears. Plasma fibrinogen level was determined following the methodology described by Thrall et al.²³ The enzymatic profile of alanine aminotransferase (AST), aspartate aminotransferase (ALT), creatinine, urea, alkaline phosphatase (AP), and gamma-glutamyltransferase (GGT) were determined by method determined by International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) (1985) using biochemical kits, and reading was performed in ALP2S equipment (Cobas® model c111).

Statistical analysis

The skin lesions of animals in each group were measured every 5 days. After each measurement, the lesion area was determined by measuring width vs. height and, the means were calculated for each group.²² These data were submitted to normality and homoscedasticity tests. When these hypotheses were satisfactory, analysis of variance and the F test were performed using a 5% significance level. Responses were also modeled according to measurement data of each treatment using the polynomial function up to the third order. In the regression analysis, the choice of models was based on the significance of linear and quadratic coefficients, using the Student *t* test at 5% probability. The linear regression equations obtained for the different treatments were compared by the contrast test between regression coefficients. Analyses were performed using the SAS statistical software, version 9.²⁴ Due to the lack of normality of data, the number of hyphae recorded in the control group and those treated with bio-AgNP was compared by the Kruskal-Wallis test. When differences were found, means were compared by the Bonferroni test. Analyses were performed using the SAS statistical software, version 9.4.²⁴

Results

Animal skin thickness at the inoculation site before disease induction was 1.96 mm². Inoculated animals developed subcutaneous nodules 25 days after *P. insidiosum* inoculation. Lesion measurements verified during the experiment ranged from 29.79 mm² (1st day of treatment) to 73.15 mm² (40th day of treatment) in group 1 (control), from 31.24 mm² (1st day of treatment) to 3.3 mm² (45th day of treatment) (group 2). It is noteworthy that in this group, one animal showed clinical cure at

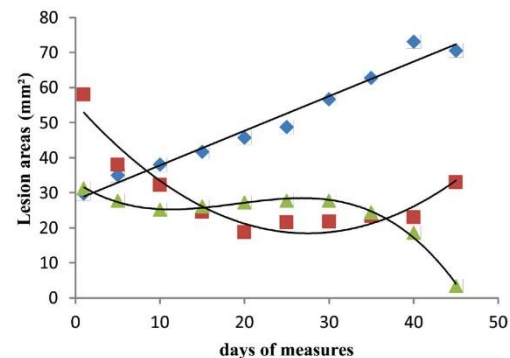


Figure 1. Subcutaneous lesion areas in rabbits experimentally inoculated with zoospores of *Pythium insidiosum* and treated with bio-AgNP. (♦) Control, (▲) gel formulation bio-AgNP, (■) intralesion bio-AgNP. Bio-AgNP, biogenic silver nanoparticles. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

35 days of treatment. In group 3, lesion areas ranged from 58.17 mm² (1st day of treatment) to 18.8 mm² (20th day of treatment). The standard deviation for lesion size was 14.10. Statistical analysis revealed that groups 2 and 3 differed from the control group ($P < .05$). It was observed that the lesions of animals treated with formulations containing bio-AgNP (groups 2 and 3) did not differ from each other ($P > .05$), showing that the route of application did not influence the regression of lesions. Injury regression analysis (Table 1) showed that group 1 (control) adjusted to an increasing linear regression, with an increase in lesions of 0.987% each day after the beginning of treatment. On the other hand, group 2 adjusted to a cubic equation, reaching maximum lesion size on day 11 after the beginning of treatment and minimum size on day 42 after the beginning of treatment. Group 3 adjusted to a quadratic regression model with minimum lesion size on day 27 after the beginning of treatment (Fig. 1).

On the cut surface, subcutaneous lesions were multilobulated, hardened, rosy-white, and highly vascularized. Some lesions had the presence of purulent discharge. The histopathology of lesions at H&E was characterized by the presence of multifocal to coalescent necrosis areas delimited by inflammatory infiltrates predominantly consisting of PMN (eosinophils). In necrosis areas, negative tubuliform images were observed for *P. insidiosum* hyphae, which were surrounded by irregular and eosinophilic

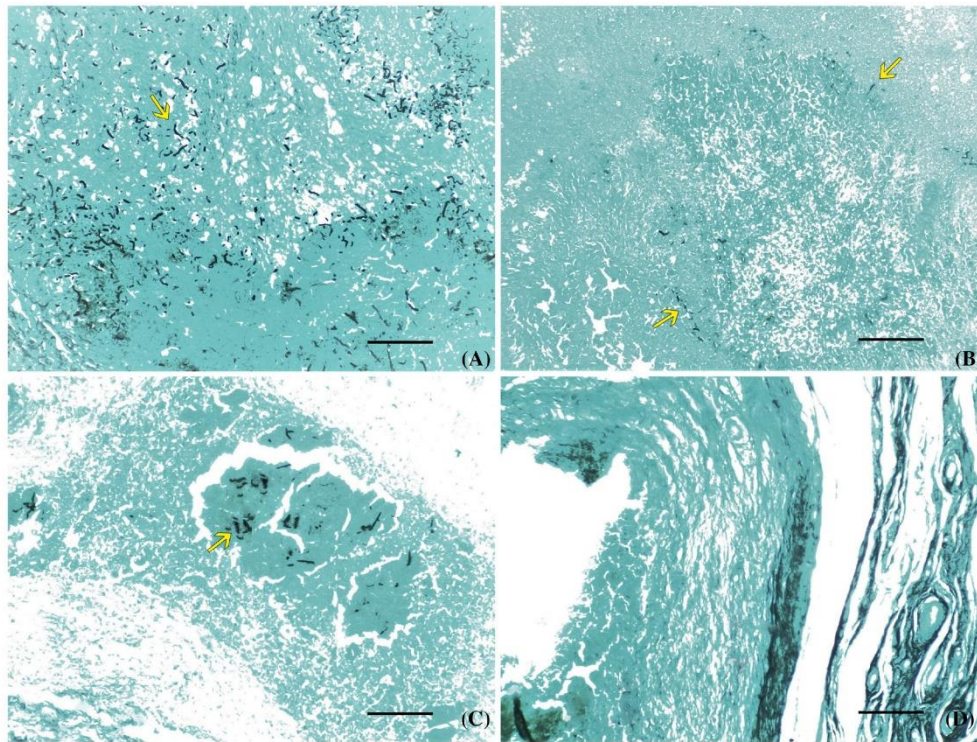


Figure 2. Subcutaneous tissue of rabbits experimentally inoculated with zoospores of *Pythium insidiosum* and treated with bio-AgNP. *P. insidiosum* hyphae with thick, brown, and irregularly branched walls (arrows). (A) Control group: the hyphae are dispersed in the field. (B) Gel formulation bio-AgNP. (C) Intralesion bio-AgNP: the hyphae are concentrated in the areas of necrosis and it can be observed that there is less amount of oomycete hyphae in the tissues. (D) Gel formulation bio-AgNP: corresponds to the clinically healed animal. Note the absence of hyphae in this necrosis area. Grocott methenamine silver (GMS) stain. 10× Objective. Scale bar (600 μ m). Bio-AgNP, biogenic silver nanoparticles. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

areas (Splendori-Hoepli reactions). Some of these reactions were bounded by Langerhans and foreign body giant cells; some of these contained hyphae. There was also an intense proliferation of fibrous connective tissue with the presence of eosinophils, plasmocytes, lymphocytes, macrophages, some giant cells, and epithelioid cells. In Grocott, hyphae with thick, brown, sparsely septated, and irregularly branched walls were preferentially located on the periphery of necrosis areas.

The number of hyphae in animals from groups 2 and 3 differed ($P < .05$) from animals from the control group, showing a smaller amount of hyphae in animals treated with bio-AgNP. There was also a difference in the hyphae distribution pattern since, in lesions of control group animals, hyphae were dispersed in the field of view, whereas in groups 2 and 3, there was higher concentration of hyphae in necrosis areas (Fig. 2).

Analyses of the pretreatment hematological profile of control group animals revealed normal hematological parameters, according to Spinelli et al.²⁵ Before treatment, animals from groups 2 and 3 presented hematological and biochemical

patterns similar to the control group. Throughout treatment, red blood cell, hemoglobin, basophil parameters, and fibrinogen remained within parameters established by Spinelli et al.²⁵ and Ameri et al.²⁶ until the end of the experiment. Mean corpuscular hemoglobin (MCH), and the number of lymphocytes remained below normal parameters; however, they were the same as those of control animals. Leukogram showed that the mean total and segmented leukocytes, as well as monocytes and eosinophils had counts above parameters considered normal. A gradual increase in neutrophils was also observed. Total protein determination revealed normal values. The biochemical profile was within standards established by Spinelli et al.²⁵ and Emanuelli et al.²⁷

Discussion

AgNPs are compounds with potential applications in the pharmaceutical, food and healthcare industries.^{15,16} They are used in the formulation of topical creams or solutions for

dermatological treatment of skin lesions.²⁸ In the healthcare area, the larvicidal action of AgNP on larval stages of *Aedes* sp. and *Culex* sp. mosquitoes, which are vectors of major public health diseases such as dengue and filariasis is highlighted.²⁹ Its application in studies aimed at formulating treatments with action on microorganisms that cause resistant infections such as bacteria,¹⁸ viruses,¹⁹ fungi,¹⁷ and oomycetes¹⁴ is also noteworthy.

The *in vitro* oomycidal activity of bioAgNP and its effects on *P. insidiosum* hyphae show that this compound may collaborate with treatment protocols of this disease.¹⁴ This previous study corroborates results presented in the present research, which demonstrates that this compound helped to reduce experimental pythiosis lesions, inducing the clinical cure of one animal. Research determining the susceptibility of *P. insidiosum* to active principles different from conventional antifungals has been explored; however, most studies are restricted to *in vitro* susceptibility testing.^{7,10,11,13,14} On the other hand, *in vivo* studies that evaluated different therapeutic protocols in experimental pythiosis, including immunotherapy,³⁰ antifungals such as caspofungin, itraconazole, and terbinafine,^{22,31} compounds with antimicrobial activity such as iron chelators, antibacterial drugs^{6,7,32,33} and plant essential oils⁹ describe results similar to those observed in the present study.

According to Lee et al.,³⁴ AgNPs have been widely explored in the biomedical field, since their cytotoxicity allows them to be used as antimicrobial and antineoplastic agents.

In the present study, the use of a topical formulation of gel containing bio-AgNP was able to reduce the lesions of experimental pythiosis, inducing the clinical cure of one animal. The use of topical action formulations containing AgNP has been reported in several studies. Wu et al.²⁷ tested dressing-impregnated AgNP and proved its local benefits by acting on bacteria such as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Pseudomonas aeruginosa*. Xi et al.³⁵ evaluated the use of silver nanocomposite hydrogel on burn injuries in rabbits and demonstrated that the hydrogel was able to reduce the inflammatory reaction and prevent secondary contamination of lesions. Similarly, Masood et al.³⁶ reported improvement in the healing process, antimicrobial, and antioxidant activity by evaluating the use of silver nanoparticle-impregnated hydrogel in rabbits with unhealed wounds induced by diabetes. Additionally, Li et al.³⁷ demonstrated that intramedullary application of AgNP was able to prevent and treat experimental *S. aureus* pyogenic spondylodiscitis in rabbits.

Although the route of application, topical or intralesion, did not differ statistically in the treatment of experimental pythiosis, it is noteworthy that the animal that showed clinical cure received topical bio-AgNP. Similarly, Fonseca et al.⁹ demonstrated that the use of topical formulation containing *Origanum vulgare* and *Mentha piperita* essential oil was able to induce the healing of one animal with experimental pythiosis. These results

suggest that the use of topical formulations containing antimicrobial compounds may be beneficial in the treatment of pythiosis in animals.

The action of silver nanocomposites on fungi and oomycetes is described in literature.^{14,17,38} Studies suggest that these compounds have the ability to act on the fungal cell membrane, causing porosities that compromise the cell membrane potential and leading cells to death by apoptosis.³⁸ In a complementary study Radhakrishnan et al.¹⁷ proposed that the fungicidal action of AgNP may be justified by the induction of apoptosis by mitochondrial impairment combined with increased oxidative stress generated by the emergence of reactive oxygen species (ROS). Previously, Valente et al.¹⁴ demonstrated the oomycidal activity of bioAgNP on *P. insidiosum*. By evaluating the effects of this compound on the oomycete by scanning electron and transmittance microscopy, these authors observed alterations in the hyphae surface, retraction and loss of continuity in the cell wall and evidenced the disappearance of intracytoplasmic organelles. These findings confirm the anti-*P. insidiosum* activity of bio-AgNP and may explain the reduction of lesion growth as well as the clinical cure of one animal treated with bio-AgNP. In addition, the absence of changes in the biochemical and hematological profile of animals suggests that the use of bio-AgNP at the evaluated concentration is safe and did not cause toxicity. Previously, Valente et al.¹⁴ showed that the *in vitro* cytotoxic concentration of bio-AgNP was 0.3 µg/ml. The hematological changes observed in control and treated animals were consistent with changes observed in animals with clinical pythiosis.⁷

Bio-AgNP formulations evaluated in the present study can be considered potential allies of integrative medicine to be applied in pythiosis therapy. Although this research is pioneer in the application of nanocomposites in the treatment of experimental pythiosis, further experiments should be carried out to evaluate the therapeutic efficacy of silver nanoparticles in animals naturally infected with *P. insidiosum*.

Supplementary material

Supplementary data are available at *MMYCOL* online.

Acknowledgments

The investigators are grateful to Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES - Finance Code 001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for student and researcher scholarships.

Declaration of interest

The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Gaastera W, Lipman LJA, De Cock AWAM et al. *Pythium insidiosum*: an overview. *Vet Microbiol*. 2010; 146: 1–16.
- Krajaeun T, Lohnoo T, Jittontam P et al. Assessment of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification and biotyping of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. *Int J Infect Dis*. 2018; 77: 61–67.
- Marcolongo-Pereira C, Sallis ESV, Rafi MB et al. Epidemiology of equine pythiosis in southern of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Pesq Vet Bras*. 2012; 32: 865–868.
- McGowan J, Fitzpatrick DA. Genomic, network, and phylogenetic analysis of the oomycete effector arsenal. *MSphere*. 2017; 2: e00408–17.
- Lerkuthirath T, Sangcakul A, Lohnoo T, Yingyong W, Rujirawat T, Krajaeun T. Evolution of the sterol biosynthetic pathway of the sterol biosynthetic pathway of *Pythium insidiosum* and related oomycetes contributes to antifungal drug resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 4: 1–37.
- Zanette RA, Alves SH, Pilotto MB et al. Iron chelation therapy as a treatment for *Pythium insidiosum* in an animal model. *J Antimicrob Chemother*. 2013; 68: 1144–1147.
- Loreto ES, Tondolo JSM, Oliveira DC, Santurio JM, Alves SH. *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone, and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018; 62: e01678–17.
- Permpalung N, Worasilchai N, Manothummetha K et al. Clinical outcomes in ocular pythiosis patients treated with a combination therapy protocol in Thailand: a prospective study. *Med Mycol*. 2019; 1: 1–6.
- Fonseca AO, Pereira DI, Botton AS 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: 265–269.
- Valente JSS, Fonseca AOS, Brasil CL et al. *In vitro* activity of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) in its free oil and nanoemulsion formulations against *Pythium insidiosum*. *Mycopathologia*. 2016; 181: 865–869.
- Valente JSS, Fonseca AOS, Denardi LB et al. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. *Mycopathologia*. 2016; 181: 617–622.
- Trolezi R, Azanha JM, Paschoal NR et al. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2017; 1: 1–7.
- Ribeiro TC, Weiblen C, Botton SA et al. *In vitro* susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc. *Med Mycol*. 2017; 55: 669–672.
- Valente J, Braga CQ, Brasil CL et al. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. *Med Mycol*. 2018; 7: 858–863.
- Yu Z, Wang W, Kong F, Lin M, Mustapha A. Cellulose nanofibril/silver nanoparticle composite as an active food packaging system and its toxicity to human colon cells. *Int J Biol Macromol*. 2019; 18: 35972–35975.
- Rujido-Santos I, Naveiro-Seijo L, Herbello-Hermelo P, Barciela-Alonso MDC, Bermejo-Barrera P, Moreda-Piñeiro A. Silver nanoparticles assessment in moisturizing creams by ultrasound assisted extraction followed by sp-ICP-MS. *Talanta*. 2019; 197: 530–538.
- Radhakrishnan VS, Reddy Mudiam MK, Kumar M. Silver nanoparticles induced alterations cellular targets, which are critical for drug susceptibilities and pathogenicity in fungal pathogen (*Candida albicans*). *Int J Nanomedicine*. 2018; 13: 2647–2663.
- Goyal S, Gupta N, Kumar A, Chatterjee S, Nimesh S. Antibacterial, anticancer and antioxidant potential of silver nanoparticles engineered using *Trigonella foenum graecum* seed extract. *IET Nanobiotechnol*. 2018; 12: 526–533.
- Szymańska E, Orłowski P, Winnicka K et al. Multifunctional tannic acid/silver nanoparticle-based mucoadhesive hydrogel for improved local treatment of HSV infection: *in vitro* and *in vivo* studies. *Int J Mol Sci*. 2018; 19: 1–21.
- Durán N, Alves OL, Esposito E, de Souza G, de Souza GI, Marcato PD. Production process of silver nanoparticles stabilized by proteins in the production of antibacterial textile products and in the treatment of the effluents produced. Braz. patent PI 0605681–4 A. Campinas: BR. Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), 2006.
- Durán N, Marcato PD, Alves OL, Souza GI, Esposito E. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. *J. Nanobiotechnology*. 2005; 3: 1–7.
- Pereira DIB, Santurio JM, Alves SH et al. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. *J Antimicrob Chemother*. 2007; 60: 1168–1171.
- Thrall MA, Weiser G, Allison RW et al., eds. Veterinary Hematology and Clinical Biochemistry 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.
- Statistical Analysis System (SAS). *SAS/STAT user guide, Version 9.4*. Cary, NC: SAS Institute, 2019.
- Spinelli MO, Motta MC, Cruz RJ, Godoy CMSC. Biochemical analytes study of rabbits plasma (New Zealand) kept in an animal facility at Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. *Rescal*. 2012; 1: 163–168.
- Ameri M, Schnaars HA, Sibley JR, Honor DJ. Determination of plasma fibrinogen concentrations in beagle dogs, Cynomolgus monkeys, New Zealand white rabbits, and Sprague-Dawley rats by using Clauss and prothrombin-time-derived assays. *J Am Assoc Lab Anim Sci*. 2011; 50: 864–867.
- Emanuelli M, Lopes ST, Maciel R, Garmatz BC, Tavares M. Alkaline phosphatase, γ -glutamyltransferase, urea and creatinine serum concentration in rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Cienc Anim Bras*. 2008; 9: 251–255.
- Wu J, Zheng Y, Song W et al. *In situ* synthesis of silver-nanoparticles/bacterial cellulose composites for slow-released antimicrobial wound dressing. *Carbohydr Polym*. 2014; 15: 762–771.
- Ghosh A, Chowdhury N, Chandra G. Plant extracts as potential mosquito larvicides. *Indian J Med Res*. 2012; 135: 581–598.
- Santurio JM, Leal AT, Leal AB et al. Three types of immunotherapies against pythiosis insidios developed and evaluated. *Vaccine*. 2003; 21: 2535–2540.
- 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: 137–142.
- Bagga B, Sharma S, Madhuri Guda SJ et al. Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. *Br J Ophthalmol*. 2018; 102: 1629–1633.
- Chatterjee S, Agrawal D. Azitromycin in the management of *Pythium insidiosum* keratitis. *Cornea*. 2018; 37: e8–e9.
- Lee BU, Yun SH, Ji JH, Bae GN. Inactivation of *S. epidermidis*, *B. subtilis*, and *E. coli* bacteria bioaerosols deposited on a filter utilizing airborne silver nanoparticles. *J Microbiol Biotechnol*. 2008; 18: 176–182.
- Xi P, Li Y, Ge X, Liu D, Miao M. Effect of nano-silver hydrogel coating film on deep partial thickness scald model of rabbit. *Saudi J Biol Sci*. 2018; 25: 797–800.
- Masood N, Ahmed R, Tariq M et al. Silver nanoparticle impregnated chitosan-PEG hydrogel enhances wound healing in diabetes induced rabbits. *Int J Pharm*. 2019; 559: 23–36.
- Li J, Tang Q, Deng L et al. Experimental study of local administration of silver nanoparticles for the treatment of pyogenic spondylitis. *J Cent South Univ T*. 2012; 37: 374–378.
- Nasrollahi A, Pourshamsian KH, Mansourkiaee P. Antifungal activity of silver nanoparticles on some of fungi. *Int J Nano Dim*. 2011; 1: 233–239.

5 Manuscritos

5.1 Manuscrito 1

Formulações de *Melaleuca alternifolia* no tratamento da pitiose experimental

Júlia de Souza Silveira Valente; Carolina Litchina Brasil; Caroline Quintana Braga;
Ândrios da Silva Moreira; Helen Cabaldi Franz; Cristina Gomes Zambrano; Cristiane
de Bona da Silva, Sônia de Avila Botton; Daniela Isabel Brayer Pereira

Será submetido a revista Medical Mycology

Formulações de *Melaleuca alternifolia* no tratamento da pitiose experimental

Júlia de Souza Silveira Valente^a; Carolina Litchina Brasil^a; Caroline Quintana Braga^a; Ândrios da Silva Moreira^a; Helen Cabaldi Franz^b; Rosimeri Zamboni^c; Eliza Simone Sallis^c; Ana Paula Albano^d; Cristina Gomes Zambrano^e; Sônia de Avila Botton^f; Daniela Isabel Brayer Pereira^a

^a Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

^b Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Faculdade de Biotecnologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

^c Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

^d Hospital de Clínicas Veterinárias, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil

^e Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

^f Laboratório de Pesquisas Micológicas, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

* Corresponding author. Tel.: +55 53 32757338; fax: +55 53 32757338. E-mail address: danielabraye@gmail.com (D.I.B. Pereira).

Resumo

Os óleos essenciais são compostos aromáticos naturais originários do metabolismo secundário das plantas que servem para sua própria proteção contra agentes externos. Dentre esses compostos, destaca-se o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* o qual possui propriedades medicinais reconhecidas, incluindo ação antimicrobiana e antitumoral. A pitiose é uma doença de difícil tratamento e de importância médica causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum*. O presente estudo objetivou avaliar a atividade da nanoemulsão (NE) de *M. alternifolia* em formulação tópica e intralesão no tratamento da pitiose experimental. A toxicidade dérmica foi testada em ratos Wistar. A reprodução da doença em coelhos foi constatada 25 dias após a inoculação das formas infectantes de *P. insidiosum*. Os animais foram divididos em 3 grupos: O grupo 1 tratado por ambas as vias sem princípio ativo. O grupo 2 recebeu tratamento tópico com uma formulação em base-gel contendo 5mg/mL de nanoemulsão de *M. alternifolia* e o grupo 3 recebeu 1mL de nanoemulsão de *M. alternifolia* em solução aquosa na concentração de 5mg/mL, aplicada via intralesão. Os animais foram tratados diariamente durante 45 dias sendo coletadas amostras de sangue para exames bioquímicos a cada 14 dias. Ao final do tratamento os mesmos foram eutanasiados e fragmentos das lesões coletados para análise histopatológica. Os animais não apresentaram toxicidade dérmica. O tratamento das lesões de pitiose com nanoemulsão de *M. alternifolia* via intralesão (grupo3) ocasionou redução das lesões de pitiose ao final do tratamento, diferindo dos grupos 1 e 2 ($P < 0.05$). Desta forma, pode inferir que o tratamento

intralesão com NE de *M. alternifolia* constitui uma boa via de aplicação desse composto para o tratamento local das lesões ocasionadas pela pitiose.

Abstract

Essential oils are natural aromatic compounds originating from the secondary metabolism of plants that serve for their own protection against external agents. Among these compounds, the alternative tea tree essential oil or which has recognized medicinal properties, including antimicrobial and antitumor action. Pythiosis is a disease of difficult treatment and of medical importance caused by the use of *Pythium insidiosum*. The present study aimed to evaluate the *M. alternifolia* nanoemulsion (NE) activity in the statistical and intralesion application in the treatment of experimental pythiosis. Demographic toxicity was tested in Wistar rats. Reproduction of the disease in rabbits was observed 25 days after inoculation of the infective forms of *P. insidiosum*. The animals were divided into 3 groups: Group 1 treated by structures as pathways with no active ingredient. Group 2 received topical treatment with base gel containing 5mg / mL of *M. alternifolia* nanoemulsion and group 3 received 1mL of *M. alternifolia*. nanoemulsion in aqueous solution of 5mg / mL concentration, applied via intralesion. The animals were treated daily for 45 days, with blood collected for biochemical tests every 14 days. At the end of the treatment, they were euthanized and fragments of lesions were collected for histopathological analysis. The animals did not show dermal toxicity. The treatment of pythiosis lesions with *M. alternifolia* nanoemulsion via intralesion (group 3) causes a reduction in pythiosis lesions at the end of treatment, differing groups 1 and 2 ($P < 0.05$). Thus, it can be inferred that intralesional treatment with NE of *M. alternifolia* may be a good route of application of this compound for the local treatment of lesions caused by pythiosis.

Introdução

Os óleos essenciais são compostos aromáticos naturais originários do metabolismo secundário das plantas que servem de proteção contra patógenos e herbívoros (BAKKALI et al., 2008). Estes compostos são conhecidos pelas suas propriedades medicinais, principalmente seu potencial antimicrobiano, o que os torna visados pela indústria farmacêutica, uma vez que o número de micro-organismos resistentes aos fármacos atingiu um *status* alarmante (AMANN; NEEF; KOHL, 2019). O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* possui propriedades medicinais reconhecidas incluindo ação antibacteriana contra micro-organismos resistentes que causam infecções na pele, ação antioxidante (KOZICS et al., 2019), atividade antifúngica contra dermatófitos (CARMO et al., 2020), aplicação odontológica no combate ao biofilme e atividade anti-inflamatória (CASARIN et al. 2019). Adicionalmente, pode atuar como um composto ativador de leucócitos contra *Candida krusei* (TULLIO et al., 2019), no tratamento de otites (BEZDJIAN et al.,

2014), bem como anestésico (SOUZA et al., 2018) e antitumoral (IRELAND et al. 2012).

A pitiose é uma doença grave de importância em medicina veterinária e humana causada pelo oomiceto aquático *Pythium insidiosum* (GAASTRA et al. 2010). Este oomiceto apresenta similaridades morfológicas com os fungos verdadeiros, no entanto, considerando sua classificação taxonômica constata-se que está mais próximo das algas diatomáceas do que dos fungos (HUDSPETH et al., 2000).

Mamíferos domésticos e selvagens, bem como o homem podem ser infectados por *P. insidiosum*. Dentre as espécies domésticas, a enfermidade assume importância econômica na criação de equinos, sendo o Brasil o país com o maior número de casos relatados nessa espécie (MARCOLONGO-PEREIRA et al., 2012). A pitiose em humanos é frequente no continente asiático, particularmente na Tailândia, onde a enfermidade apresenta taxas elevadas de letalidade (HILTON et al., 2016). É uma enfermidade de prognóstico desfavorável e os protocolos terapêuticos disponíveis, incluindo cirurgia, imunoterapia e fármacos antifúngicos nem sempre resultam na cura da doença (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003; MENDOZA, NEWTON, 2005).

Devido às frequentes falhas terapêuticas e as dificuldades encontradas no tratamento da pitiose, na última década diversas pesquisas foram desenvolvidas no sentido de buscar terapias alternativas para a doença. Esses estudos avaliaram a atividade anti-*P. insidiosum* de fármacos com atividade antibacteriana (ITAQUI et al., 2016; JESUS et al., 2016; BAGGA et al., 2018; CHATTERJEE; AGRAWAL, 2018; LORETO et al., 2018), antifúngicos, como caspofungina, micafungina, terbinafina (PEREIRA et al., 2007; ZANETTE et al., 2015; JESUS et al., 2016; ITAQUI et al., 2016), antiparasitário como miltefosina (LORETO et al., 2019) e óleos essenciais de plantas medicinais e compostos naturais (FONSECA et al., 2015; ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; VALENTE, 2016a,b; TROLEZI; AZANHA, 2017).

Valente et al. (2016a, b, c) demonstraram que o óleo essencial de *M. alternifolia* possui boa atividade anti-*P. insidiosum* tanto na sua formulação pura, como em nanoemulsão. Todavia, evidenciaram que a formulação em nanoemulsão do óleo teve atividade antimicrobiana mais eficaz sobre o oomiceto.

Previamente, Fonseca et al. (2015) ao avaliar uma formulação em gel contendo óleos essenciais no tratamento tópico da pitiose experimental em coelhos

obtiveram resultados promissores na associação do óleo essencial de *Mentha piperia* e *Origanum vulgare*. Similarmente Valente et al. (2020) demonstraram que tanto a formulação em base gel não iônica contendo nanopartículas biogênicas de prata, aplicada topicamente, quanto a formulação aquosa aplicada no interior das lesões cutâneas de pitiose reproduzida experimentalmente em coelhos foram capazes de reduzir o tamanho das lesões.

O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade de uma nanoemulsão (NE) de *M. alternifolia* em formulação tópica e intralesão no tratamento da pitiose experimental.

Metodologia

Nanoemulsão de *Melaleuca alternifolia*

O óleo essencial de *M. alternifolia* foi obtido comercialmente (Laszlo Aromatherapy Ltd, Belo Horizonte, Brasil) acompanhado de laudo que estabelece seus componentes majoritários. De acordo com o fabricante a composição do óleo consistiu em: terpineno-4-ol (40 - 52%), γ -terpineno (6 - 20%), α -terpineno (11 - 16%), 1,8 cineol (1 - 2%), terpineol (5%), limoneno (3 a 4%), pineno (3 a 5%) e terpinoleno (1 a 5%). Para formular a nanoemulsão contendo 1% de *M. alternifolia* (10.000 μg / mL) preconizou-se o método de emulsificação espontânea dentro da faixa de aproximadamente 200 nm, potencial zeta negativo e índice de polidispersão abaixo de 0,25 (BOUCHEMAL et al., 2004; FLORES et al., 2011).

Ensaio de toxicidade dérmica

Foram utilizados 30 ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) com 60 dias de idade, mantidos no Biotério da Universidade Federal de Pelotas em condições controladas de temperatura ($22\pm 1^\circ\text{C}$) e umidade relativa do ar (60-70%), com água e ração *ad libitum* e ciclo de claro/escuro de doze horas. Os animais foram divididos em três grupos de dez animais (cinco machos e cinco fêmeas), sendo aclimatados durante 5 dias. Os animais do grupo controle (n=10) foram tratados diariamente por aplicação tópica de uma base de gel não iônica sem princípio ativo. Os grupos tratados receberam a aplicação tópica diária de uma formulação em gel não iônico contendo concentrações de 2.130 (n=10) e 5000 $\mu\text{g/mL}$ (n=10), conforme determina o protocolo

para testes de toxicidade dérmica (OECD-Guideline For Testing Of Chemicals, 1981).

Os animais foram pesados e tricotomizados na região dorsal não ultrapassando 10% da área corporal total. Diariamente a área tricotomizada recebeu aplicação dérmica diária de um grama das formulações durante 28 dias. Imediatamente antes de cada aplicação, a região tratada era avaliada considerando-se os seguintes parâmetros: perda de peso, alteração comportamental, presença de inflamação, edema ou hiperemia. Após esse período, os animais foram eutanasiados de acordo com os protocolos padrões e fragmentos representativos dos tecidos do local de aplicação foram enviados para análise histopatológica.

Reprodução experimental e tratamento da pitiose

Nove coelhos da raça Nova Zelândia, fêmeas, com 90 dias de idade foram utilizados para a reprodução experimental da pitiose. Os animais foram mantidos nas dependências do biotério central da UFPel, sendo alocados em gaiolas individuais, com temperatura ambiente controlada (25°C), higiene e luz adequadas, recebendo água *ad libitum* e ração conforme seu peso corporal. Para a reprodução experimental da doença, um volume de 1mL de meio de indução contendo aproximadamente 32.500 zoósporos viáveis de *P.insidiosum* foi inoculado por via subcutânea, na região dorsal direita, conforme descrito por Pereira et al. (2007). Diariamente os animais eram inspecionados para avaliar o crescimento das lesões e as suas condições clínicas.

Vinte e cinco dias após a inoculação de zoósporos de *P. insidiosum*, os animais desenvolveram nódulos subcutâneos. Neste momento, os coelhos foram divididos aleatoriamente em grupos de três animais, a área de lesão foi tricotomizada e o tratamento foi iniciado. O grupo1 (controle) recebeu aplicação tópica diária de cinco gramas de uma formulação em base-gel não iônica na área de lesão e administração de 1mL de água destilada estéril intralesão a cada 48h. O grupo 2 foi tratado diariamente com cinco gramas de uma formulação em base-gel contendo 5mg/mL de nanoemulsão de *M. alternifolia* e o grupo 3 recebeu 1mL de nanoemulsão de *M. alternifolia* em solução aquosa na concentração de 5mg/mL, administrada intralesão a cada 48h. Seguindo a metodologia previamente descrita por Valente et al. (2020), a formulação em gel foi aplicada na superfície da lesão e movimentos circulares dos dedos foram realizados até obter-se a absorção completa

do gel. Na via intralesão, 1mL de água destilada estéril ou 1 mL de solução aquosa de nanoemulsão de *M. alternifolia* foi administrado na lesão com o auxílio de uma seringa de insulina BD Ultra-Fine™.

O quadro clínico dos animais e a progressão das lesões foram observados diariamente no decorrer do experimento. A cada cinco dias a área de lesão foi medida com auxílio de um paquímetro. Ao final do experimento (45 dias após o início dos tratamentos) os animais foram eutanasiados de acordo com os protocolos padrões. Para proceder a análise histopatológica, fragmentos das lesões subcutâneas e órgãos (pulmão, fígado, baço, rins) foram coletados e fixados em solução de formalina 10%, rotineiramente processados e corados por Hematoxilina-Eosina (HE) e Methenamine Silver (Grocott).

Para cada grupo de animais, as hifas impregnadas pela prata em Grocott foram quantificadas através da contagem em dez campos microscópicos selecionados aleatoriamente.

Todos os procedimentos com os animais foram previamente submetidos e aprovados pela Comissão de Ética e Experimentação Animal da UFPel.

Perfil hematológico e bioquímico

Para avaliar o perfil hematológico dos animais inoculados, amostras de sangue foram coletadas antes de iniciar os tratamentos e a cada 15 dias até o final do experimento. O eritrograma e o leucograma foram realizados em equipamento hematológico automático Poch – 100iVDiff®5. Esfregaços sanguíneos foram realizados para avaliação da morfologia das hemácias e diferencial leucocitário. O nível de fibrinogênio plasmático foi determinado seguindo a metodologia descrita por Thrall et al. (2015).

O perfil enzimático de alanina aminotransferase (AST), aspartatoaminotransferase (ALT), creatinina, uréia, fosfatase alcalina (FA) e gama-glutamilttransferase (GGT) foram determinados pelo método determinado pela IFCC (1985) utilizando kits bioquímicos e a leitura foi realizada no equipamento ALP2S (Cobas® modelo c111).

Análise estatística

Os nódulos subcutâneos dos animais em cada grupo foram medidos a cada cinco dias. Após cada medida, a área da lesão foi determinada medindo largura x

altura e as médias foram calculadas para cada grupo (Valente et al., 2020). Esses dados foram submetidos à normalidade e testes de homocedasticidade. Quando essas hipóteses foram satisfatórias, análise de variância e teste F foram realizadas usando nível de significância de 5%. As respostas foram também modeladas de acordo com os dados das medidas para cada tratamento usando a função polinomial até terceira ordem. Na análise de regressão, a escolha dos modelos baseou-se na significância dos coeficientes linear e quadrático, utilizando o teste t de Student com 5% de probabilidade. As equações de regressão linear obtidas para os diferentes tratamentos foram comparadas pelo teste de contraste entre os coeficientes de regressão.

Devido à falta de normalidade dos dados, o número de hifas registradas no grupo controle e grupos tratados com nanoemulsão de *M. alternifolia* foram comparados pelo teste de Kruskal-Wallis. Quando diferenças foram encontradas, as médias foram comparadas pelo teste de Bonferroni. As análises foram realizadas no software estatístico SAS, versão 9.4 (SAS, 2019).

Resultados

Toxicidade dérmica

Os animais apresentaram peso corporal variando entre 240 a 300g durante o período de avaliação. Os animais não evidenciaram alteração de comportamento ou perda de peso. O local de aplicação não evidenciou inflamação, edema ou hiperemia. A análise histopatológica também não evidenciou alteração na composição do tecido.

Tratamento da pitiose experimental

Todos os animais desenvolveram nódulos subcutâneos palpáveis 25 dias após a inoculação de zoóporos de *P. insidiosum*. Durante o desenvolvimento do experimento, os coelhos do grupo 1 (controle) apresentaram lesões que variaram de 29,79 mm² (1º dia do tratamento) a 73,15 mm² (40º dia do tratamento). No grupo 2 (formulação de NE de *M. alternifolia* aplicada via tópica), as medidas variaram de 45,21mm² (1º dia do tratamento) a 54,61mm² (10º dia do tratamento) e o grupo 3 (solução aquosa de NE de *M. alternifolia* administrada intralesão), a mensuração dos

nódulos variou de 23,37 mm² (5º dia do tratamento) a 41,91mm² (40º dia do tratamento).

Na análise estatística verificou-se que o grupo 3 (animais tratados com solução aquosa de nanoemulsão de *M. alternifolia* intraleão) diferiu do grupo controle (grupo 1) e do grupo 2 (coelhos tratados topicamente com formulação gel de nanoemulsão de *M. alternifolia*) ($P < 0.05$). Este último grupo, por sua vez, não diferiu do grupo controle ($P = 0.05$). A análise de regressão das lesões, evidenciou que o grupo 1 ajustou-se a uma regressão linear crescente, apresentando um aumento das lesões de 0,987% a cada dia após o início do tratamento ($\hat{Y} = 27,91 + 0,987x$; R^2 96.94%, $P < 0.0001$). O grupo 3 também ajustou-se a uma regressão linear crescente ($\hat{Y} = 24,38 + 0,359x$; R^2 64,20%, $P = 0,0053$), sendo possível evidenciar um aumento de 0.359% das lesões a cada dia de tratamento. Por outro lado, as lesões dos coelhos do grupo 2 evidenciaram um comportamento cúbico ($\hat{Y} = 45,40 + 1,323x - 0,0657x^2 + 0,000869x^3$, R^2 71,44; $P = 0,0153$) com o maior tamanho de lesões no 40º dia após o início do tratamento.

Em todos os animais infectados, a superfície de corte dos nódulos subcutâneos apresentava-se endurecida, multilobulada, branco-rosada, bastante vascularizada e, em algumas lesões, havia a presença de exudato purulento. Em hematoxilina-eosina, a histopatologia revelou áreas multifocais a coalescentes de necrose, delimitadas por infiltrados inflamatórios de polimorfonucleares (predominantemente eosinófilos), linfócitos, macrófagos, células gigantes tipo corpo estranho e células de Langerhans. Nas áreas de necrose e no interior de algumas células gigantes, imagens tubuliformes negativas, condizentes com hifas de *P. insidiosum* foram observadas. Estas imagens encontravam-se rodeadas por intensa reação eosinofílica (reações de Splendori-Hoepli). Hifas de paredes espessas, marrons, esparsamente septadas e irregularmente ramificadas, concentradas nas áreas de necrose foram evidenciadas no Grocott.

Embora o aspecto histológico das lesões tenha sido similar em todos os grupos experimentais, notou-se, na coloração de Grocott, que o número de hifas no grupo controle (grupo 1) estavam em maior quantidade e concentradas nas áreas de necrose, enquanto nos demais grupos (2 e 3), as hifas apresentavam-se em menor quantidade e dispersas pelo tecido, diferindo do grupo controle ($P < 0.05$).

O exame hematológico no período que antecedeu a indução da pitiose revelou que os animais apresentavam parâmetros hematológicos normais, conforme os critérios estabelecidos por Spinelli et al. (2012).

Ao longo do tratamento, os parâmetros de hemácias, hemoglobina, fibrinogênio e basófilos se mantiveram dentro dos parâmetros estabelecidos por Spinelli et al. (2012) e Ameri et al. (2011) até o final do experimento. A hemoglobina corpuscular média (CHCM) e o número de linfócitos se mantiveram relativamente abaixo desses parâmetros, entretanto, esses resultados foram similares aos animais do grupo controle. O leucograma evidenciou que a média de leucócitos totais, segmentados, monócitos e eosinófilos apresentavam contagens acima dos parâmetros considerados normais para a espécie. A determinação de proteínas totais revelou valores normais, bem como o perfil bioquímico manteve-se dentro dos padrões estabelecidos por Spinelli et al. (2012) e Emanuelli et al. (2008).

Discussão

O óleo essencial de *M. alternifolia* começou a ser utilizado com fins medicinais pela medicina tropical australiana. Todavia, suas relevantes propriedades antimicrobianas despertaram o interesse e suas aplicações médicas foram mundialmente ampliadas (PISSERI et al., 2009). Segundo Pazyar et al. (2012) este composto possui uma gama de propriedades de ação dermatológica, incluindo atividade antibacteriana, antifúngica, antiprotzoária, antioxidante, antiacne, bem como ação contra dermatite seborreica, antitumoral e cicatrizante, entre outras aplicações.

O mecanismo antimicrobiano do óleo essencial de *M. alternifolia* pode ser justificado pela ocorrência de lesões e alterações nas células microbianas. Swamy, Akhtar e Sinniah (2016) evidenciaram que os óleos essenciais causam danos irreversíveis na membrana da célula fúngica e consequente coagulação dos componentes celulares. Esses autores ainda sugerem que os óleos essenciais podem penetrar a parede celular fúngica, aumentando a sua permeabilidade e causando alteração no fluxo de elétrons, o que leva a desintegração das membranas mitocondriais e apoptose da célula fúngica. Adicionalmente, Kong et al. (2019) demonstraram que o óleo essencial de *M. alternifolia* provocou o surgimento de

1 pontos de interrupção nas hifas e extravazamento do citoplasma quando
2 administrado sobre células de *Aspergillus ochraceus*.

3 Previamente, Valente et al. (2016) demonstraram em ensaios *in vitro* a ação
4 do óleo de *M. alternifolia* na forma livre e em nanoemulsão sobre isolados de *P.*
5 *insidiosum*. Esses autores observaram que as nanoemulsões foram mais eficientes
6 que o óleo livre, pois eram capazes de inibir o crescimento de *P. insidiosum* em
7 concentrações mais baixas, sugerindo que a nanoformulação possa preservar a
8 estabilidade do composto e torná-lo mais eficiente na eliminação do patógeno.

9 Estudos envolvendo o emprego de protocolos terapêuticos com substâncias
10 de ação tópica/local para o tratamento da pitiose cutânea são incipientes. Nesta
11 pesquisa, avaliou-se a eficácia de duas formulações: uma formulação em base-gel
12 contendo 5mg/mL de nanoemulsão de *M. alternifolia* aplicada topicamente sobre a
13 lesão; e uma formulação de solução aquosa contendo 5mg/mL de nanoemulsão de
14 *M. alternifolia* administrada via intralesão. Os resultados obtidos evidenciaram que a
15 formulação aquosa intralesão foi superior, contribuindo significativamente para a
16 regressão das lesões. Por outro lado, a formulação em base-gel empregada por via
17 tópica não diferiu do grupo controle ($P>0.05$). Estes resultados diferem de Fonseca
18 et al. (2015) que obtiveram a cura clínica de um animal com pitiose experimental
19 empregando a aplicação tópica de uma formulação em base de gel contendo uma
20 associação de óleo essencial de *M. piperita* e *O. vulgare*. Adicionalmente, diferem
21 dos resultados relatados por Valente et al. (2020) que não evidenciaram diferença
22 no tamanho das lesões de pitiose em coelhos tratados por via tópica com uma
23 formulação em base gel contendo nanopartículas biogênicas de prata ou tratados
24 por via intralesão com uma solução aquosa de nanopartículas biogênicas de prata.
25 Esses autores ainda relataram a cura clínica de um animal tratado com a formulação
26 tópica em base gel.

27 Embora o tamanho das lesões dos animais tratados topicamente com a
28 formulação em base gel não tenha diferido dos demais grupos experimentais,
29 observou-se que a quantidade e a distribuição de hifas de *P. insidiosum* no interior
30 das lesões foram menores, quando comparadas ao grupo controle ($P<0.05$),
31 indicando que este tratamento teve alguma ação no processo de infecção. Contudo,
32 acredita-se que a pouca eficácia do tratamento tópico na regressão das lesões
33 possa ter ocorrido pela instabilidade do óleo essencial de *M. alternifolia*. Segundo
34 Bakkali et al. (2008) essa instabilidade pode ocorrer devido aos seus componentes

voláteis tais como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, fenóis, entre outros presentes nas estruturas da planta. Por outro lado, Pisseri et al. (2009) afirmaram que devido à sua estrutura lipofílica, o óleo essencial de *M. alternifolia* possui uma boa capacidade de ser absorvido pela pele, com isso, pode ser utilizado por aplicação local no caso das infecções que atingem os tecidos que compõem a pele.

Acredita-se que a via de aplicação intralesão possa ter contribuído na melhor preservação da nanoemulsão, evitando sua volatilização e resultando numa melhor distribuição e ação antimicrobiana. Sendo assim, estes resultados sugerem que a via intralesão pode ser vantajosa no tratamento da pitiose cutânea empregando formulações contendo óleo essencial de *M. alternifolia*. Recentemente, Valente et al. (2020) não observaram diferença entre a via tópica e intralesão ao tratar coelhos com pitiose cutânea experimental empregando formulações contendo nanopartículas biogênicas de prata. Previamente, formulações contendo óleo essencial de *M. alternifolia* foram empregadas por Bezdjian et al. (2014) no tratamento de otite em chinchilas por administração injetável na membrana timpânica. Posteriormente, Souza et al. (2018) demonstraram o efeito anestésico do óleo essencial de *M. alternifolia* nanoencapsulado em crustáceos. Ao compararem duas vias de aplicação, estes autores constataram que a via injetável foi mais eficiente como anestésico do que o banho de imersão.

A ausência de alterações nos testes de toxicidade dérmica em camundongos, bem como os parâmetros hematológicos e bioquímicos dos animais tratados com as formulações contendo óleo essencial de *M. alternifolia*, sugerem que o emprego dessas formulações são seguras, não causando toxicidade aos animais tratados. Similarmente, Bezdjian et al. (2014) e Souza et al. (2018) não evidenciaram toxicidade ao empregar óleo essencial de *M. alternifolia* no tratamento de otite em chinchilas e como substância anestésica em crustáceos, respectivamente. No presente estudo, as alterações hematológicas observadas nos animais controle e tratados foram similares às alterações observadas nos animais com pitiose clínica (LORETO et al., 2019).

Conclusão

As formulações contendo nanoemulsão de óleo essencial de *M. alternifolia* empregadas neste estudo mostram-se seguras para utilização por via tópica e

injetável. Este trabalho é pioneiro na aplicação de diferentes formulações contendo nanoemulsão de óleo essencial de *M. alternifolia* no tratamento da pitiose. A formulação aquosa administrada intralesão pode vir a se constituir numa terapia a ser adicionada aos protocolos terapêuticos já estabelecidos para o tratamento da pitiose clínica. No entanto, experimentos avaliando a eficácia deste óleo essencial em animais naturalmente infectados são requeridos para validar o emprego desta terapia.

Referências

AMANN, S., NEEF, K., KOHL, S. Antimicrobial resistance (AMR). **European Journal of Hospital Pharmacy**, v.26, p.175–177, 2019.

AMERI, M.; SCHNAARS, H.A.; SIBLEY, J.R.; HONOR, D.J. Determination of plasma fibrinogen concentrations in beagle dogs, Cynomolgus monkeys, New Zealand white rabbits, and Sprague-Dawley rats by using Clauss and prothrombin-time-derived assays. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Scienc**, v.50, p. 864-867, 2011.

BAGGA, B.; SHARMA, S.; GUDA, S.J.M.; NAGPAL, R.; JOSEPH, J.; MANJULATHA, K.; MOHAMED, A.; GARG, P. Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. **British Journal of Ophthalmolog**, v.102, n.12, p. 1629-1633, 2018.

BEZDJIAN, A.; MUJICA-MOTA, M.A.; AZZI, M.; DANIEL, S.J. Assessment of ototoxicity of tea tree oil in a chinchilla animal model. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v.78, p.2136–2139, 2014.

BOUCHEMAL, K.; BRIANÇON, S.; PERRIER, E.; FESSI, H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. **International Journal of Pharmaceutics**; v.280, p.241–251, 2004.

CARMO, P.H.F.; COSTA, M.C.; FRANCO, P.H.C.; LAGE, A.C.P.; ROCHA, C.E.V.; CHAVES, C.R.; FARACO, A.A.G.; LADEIRA, L.O.; AGUILAR, J.L.L.; CÉSAR, I.C.; PAIXÃO, T.A.; RESENDE-STOIANOFF, M.A.; SANTOS, D.A. Essential oils of *Taxandria fragrans* and *Melaleuca alternifolia* have effective antidermatophytic activities in vitro and in vivo that are antagonised by ketoconazole and potentiated in gold nanospheres. **Natural Product Research**, v.2, p.1-4, 2020.

CASARIN, M.; PAZINATTO, J.; OLIVEIRA, L.M.; SOUZA, M.E.; SANTOS, R.C.V.; ZANATTA, F.B. Anti-biofilm and anti-inflammatory effect of a herbal nanoparticle mouthwash: a randomized crossover trial. **Brazilian Oral Research**, v.20, 33:e062, 2019.

CHATTERJEE, S.; AGRAWAL, D. Azitromycin in the management of *Pythium insidiosum* keratitis. **Cornea**, v.37, n.2, p.e8-e9, 2018.

EMANUELLI, M.; LOPES, S.T.; MACIEL, R.; GARMATZ, B.C.; TAVARES, M. Concentração sérica de fosfatase alcalina, gama-glutamil transferase, uréia e creatinina em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*). **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.1, p.251-255, 2008.

PISSERIA, F.; BERTOLIB, A.; NARDONIC, S.; PINTOC, L.; PISTELLIB, L.; GUIDID, G.; MANCIANTIC, F. Antifungal activity of tea tree oil from *Melaleuca alternifolia* against *Trichophyton equinum*: An in vivo assay. **Phytomedicine**, v.16, p.1056–1058, 2009.

FLORES, F.C.; RIBEIRO, R.F.; OURIQUE, A.F.; ROLIM, C.M.B.; SILVA, C.B.; POHLMANN, A.R.; BECK, R.C.R.; GUTERRES, S.S. Nanostructured systems containing an essential oil: protection against volatilization. **Química Nova**, v.34, p.968–972, 2011.

FOIL, C.S.O. Update on pythiosis (Oomycosis). **The North American Veterinary Conference**, v.925, p.57-63, 1996.

FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; BOTTON, S.A.; PÖTTER, L.; SALLIS, E.S.; JÚNIOR, S.F.; FILHO, F.S.; ZAMBRANO, C.G.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.; BAPTISTA, C.T.; BRAGA, C.Q.; BEN, V.D.; MEIRELES, M.C. 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, 2015.

GAASTRA, W.; LIPMAN, L.J.; DE COCK, A.W.; EXEL, T.K.; PEGGE, R.B.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.1–16, 2010.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **Veterinary Clinics of North America**, v.33, p.695-620, 2003.

HUDSPETH, D.S.S.; NADLER, S.A.; HUDSPETH, M.E.S. A COX2 molecular phylogeny of the peronosporomycetes. **Mycologia**, v.92, n.4, p.674-684, 2000.

IRELAND, D.J.; GREAY, S.J.; HOOPER, C.M.; KISSICK, H.T.; FILION, P.; RILEY, T.V.; BEILHARZ, M.W. Topically applied *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil causes direct anti-cancer cytotoxicity in subcutaneous tumour bearing mice. **Journal of Dermatological Science**, v.67, p.120–129, 2012.

ITAQUI, S.R.; VERDI, C.M.; TONDOLO, J.S.; DA LUZ, T.S.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M.; LORETO, É.S. *In vitro* synergim between azithromycin or terbinafine and tropical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.8, p. 5023-5025, 2016

JESUS, F.P. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.1, p.87-91, 2016.

KOZICS, K.; BUČKOVÁ, M.; PUŠKÁROVÁ, A.; KALÁSZOVÁ, V.; CABICAROVÁ, T.; PANGALLO, D. The Effect of Ten Essential Oils on Several Cutaneous Drug-Resistant Microorganisms and Their Cyto/Genotoxic and Antioxidant Properties. **Molecules**, v.24, n.24, E4570, 2019.

KRAJAEJUN, T.; LOHNOO, T.; JITTORNTAM, P.; SRIMONGKOL, A.; KUMSANG, Y.; YINGYONG, W.; RUJIRAWAT, T.; REAMTONG, O.; MANGMEE, S. Assessment of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification and biotyping of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **International Journal of Infectious Diseases**, v.77, p.61-67, 2018.

LORETO, E.S.; TONDOLO, J.S.M.; OLIVEIRA, D.C.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.3, p.1678-1717, 2018a.

LORETO, E.S.; TONDOLO, J.S.M.; JESUS, F.P.K.; ENGELMANN, A.M.; ANDRADE, C.M.; SANTURIO, J.M.; ZANETTE, R.A.; KOMMERS, G.D.; SILVA, T.M.; ALVES, S.H. Efficacy of miltefosine therapy against subcutaneous experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale**, 2019.

MAHL, D.L.; DE JESUS, F.P.; LORETO, É.; ZANETTE, R.A.; FERREIRO, L.; PILOTTO, M.B.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* isolates to aminoglycoside antibiotics and tigecycline. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.7, p.4021-4023, 2012.

SWAMY, M.K.; AKHTAR, M.S.; SINNIAH, U.R. Antimicrobial Properties of Plant Essential Oils against Human Pathogens and Their Mode of Action: An Updated Review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, p. 1-21, 2016.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E.S.V.; RAFI, M.B.; PEREIRA, D.I.B.; HINNAH, F.L.; COELHO, A.C.B.; SCHILD, A.L. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p.865-868, 2012.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p.55-63, 1983.

PAZYAR, N.; YAGHOobi, R.; BAGHERANI, N.; KAZEROUNI, A. A review of applications of tea tree oil in dermatology. **International Journal of Dermatology**, v.52, n.7, p.784-790, 2012.

OECD (Organization for Economic Cooperation and Development): Guideline for The Testing of Chemicals), 410: "Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study", Adopted 12 May 1981.

PEREIRA, D.I.B.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; ARGENTA, J.S.; PÖTTER, L.; SPANAMBERG, A.; FERREIRO, L. Caspofungin *in vitro* and *in vivo* activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.60, p.1168–1171, 2007.

PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism. **Mycopathologia**, 2019.

KONG, Q.; ZHANG, L.; AN, P.; QI, J.; YU, X.; LU, J.; REN, X. Antifungal mechanisms of α-terpineol and terpene-4-alcohol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v.126, p.1161—1174, 2019.

ROMERO, A.; GARCÍA, J.; BALESTIÉ, S.; Malfatto, F.; VICENTINO, A.; SALLIS, E.S.V.; SCHILD, A.L.; DUTRA, F.Q. Equine pythiosis in the eastern wetlands of Uruguay. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.39, n.7, p.469-475, 2019.

SOUZA, C.F.; LIMA, T.; BALDISSERA, M.D.; GEIHS, M.A.; MACIEL, F.E.; NERY, L.E.M.; SANTOS, R.C.V.; RAFFIN, R.P.; HEINZMANN, B.M.; CARON, B.O.; BALDISSEROTTO, B. Nanoencapsulated *Melaleuca alternifolia* essential oil exerts anesthetic effects in the brachyuran crab using *Neohelice granulata*. **Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.3, p.2855-2864, 2018.

SPINELLI, M.O.; MOTTA, M.C.; CRUZ, R.J.; GODOY, C.M.S.C. Estudo dos analitos bioquímicos no plasma de coelhos (nova zelândia) mantidos no biotério da faculdade de medicina da Universidade de São Paulo. **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v.1, p.163-168, 2012.

Statistical Analysis System (SAS). (2019) SAS/STAT user guide, Version 9.4. Cary, NC: SAS Institute.

THRALL, M.A.; WEISER, G.; ALLISON, R.W, et al. (eds.) **Hematologia e bioquímica clínica veterinária** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2015.

TULLIO, V.; ROANA, J.; SCALAS, D.; MANDRAS, N. Enhanced Killing of *Candida krusei* by Polymorphonuclear Leucocytes in the Presence of Subinhibitory Concentrations of *Melaleuca alternifolia* and "Mentha of Pancalieri" Essential Oils. **Molecules**, v.24, n.21, 2019.

ZANETTE, R.A.; JESUS, F.P.; PILOTTO, M.B.; WEIBLEN, C.; PÖTTER, L.; FERREIRO, L.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. Micafungin alone and in combination therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Médicale**, v.25, n.1, p. 91-94, 2015.

Acompanhamento das lesões ao longo do tratamento

Tabela Suplementar S1: Dados demonstrando a área da lesão (A) e a progressão da lesão (%) de coelhos do grupo 1 (Controle) inoculados com zoósporos de *P. insidiosum*.

Medida	Unidade	Dia										
		1°	5°	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°	45°	%*
Coelho												
1	L	5,55	5,67	5,69	5,69	5,74	6,24	5,8	6,5	7,10	7,71	77,03
	A	5,9	5,89	6,2	6,2	6,4	5,92	7,18	7,89	8,4	7,51	
	Ar	32,70	33,48	35,28	35,8	36,73	36,95	41,64	51,28	59,68	57,89	
2	L	5,40	6,70	3,18	6,8	7,38	8,6	8,55	8,75	9,2	9,18	187,39
	A	5,1	6,71	3,15	7,8	8,57	8,17	8,55	8,77	9,75	9,14	
	A2	29,20	41,4	45,04	53,60	63,25	70,26	73,11	76,73	89,75	83,92	
3	L	5,24	5,50	1,55	5,96	5,95	6,02	7,41	7,76	9,0	9,0	154,89
	A	5,24	5,51	1,68	5,96	6,25	6,5	7,45	7,76	7,8	7,8	
	Ar	27,47	30,27	33,66	35,5	37,18	39,10	55,21	60,21	70,02	70,02	
Média do dia		29,79	35,05	38,1	41,66	45,72	48,77	56,64	62,74	73,15	70,61	137

L= largura (em mm); A = altura (em mm); Ar = área da lesão em mm². % * = (área da lesão2 * x100 / área da lesão1 *) -100; *em que a área da lesão 2 corresponde à medida atual e a área da lesão 1 corresponde à medida anterior.

- 1 **Tabela Suplementar S2:** Dados demonstrando a área da lesão (A) e a progressão da lesão (%) dos coelhos do grupo 2 inoculados com zoósporos de *P.*
 2 *insidiosum* e tratados com uma formulação à base de gel de nanoemulsão de *M. alternifolia*.

Medida	Unidade	Dia										
		1°	5°	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°	45°	%*
Coelho												
1	L	6,64	6,77	6,96	7,62	7,93	7,00	6,91	7,16	7,68	8,01	36,99
	A	6,71	6,79	7,01	6,98	6,71	7,58	7,31	7,16	7,68	7,62	
	Ar	44,55	45,97	48,78	53,19	53,21	53,06	50,52	51,2	58,98	61,03	
2	L	6,40	7,44	8,10	7,5	6,94	6,94	7,12	6,91	6,90	6,25	2,65
	A	7,01	7,45	6,90	6,93	6,98	7,22	7,03	6,91	6,92	7,37	
	A2	44,87	55,42	55,89	51,97	48,44	50,10	50,01	47,75	47,74	46,06	
3	L	6,91	7,40	7,69	7,63	7,16	7,07	7,04	6,70	6,70	5,89	-6,85
	A	6,69	7,41	7,7	6,89	6,99	7,01	7,04	6,74	6,71	7,31	
	Ar	46,22	54,83	59,21	52,59	50,04	50,01	49,6	45,1	44,95	43,05	
Média do dia	45,21		52,07	54,61	52,58	50,55	51,05	50,04	48,01	50,55	50,04	10,68

- 3 L= largura (em mm); A = altura (em mm); Ar = área da lesão em mm². % * = (área da lesão2 * x100 / área da lesão1 *) -100; *em que a área da
 4 lesão 2 corresponde à medida atual e a área da lesão 1 corresponde à medida anterior.

- 1 **Tabela Suplementar S3:** Dados demonstrando a área da lesão (A) e a progressão da lesão (%) dos coelhos do grupo 3 inoculados com zoósporos de *P.*
 2 *insidiosum* e tratados com nanoemulsão de *M. alternifolia* intralesão.

Medida	Unidade	Dia										
		1°	5°	10°	15°	20°	25°	30°	35°	40°	45°	%*
Coelho												
1	L	6,64	6,77	6,96	7,62	7,93	7,00	6,91	7,16	7,68	8,01	36,99
	A	6,71	6,79	7,01	6,98	6,71	7,58	7,31	7,16	7,68	7,62	
	Ar	44,55	45,97	48,78	53,19	53,21	53,06	50,52	51,2	58,98	61,03	
2	L	6,40	7,44	8,10	7,5	6,94	6,94	7,12	6,91	6,90	6,25	2,65
	A	7,01	7,45	6,90	6,93	6,98	7,22	7,03	6,91	6,92	7,37	
	A2	44,87	55,42	55,89	51,97	48,44	50,10	50,01	47,75	47,74	46,06	
3	L	6,91	7,40	7,69	7,63	7,16	7,07	7,04	6,70	6,70	5,89	-6,85
	A	6,69	7,41	7,7	6,89	6,99	7,01	7,04	6,74	6,71	7,31	
	Ar	46,22	54,83	59,21	52,59	50,04	50,01	49,6	45,1	44,95	43,05	
Média do dia		45,21	52,07	54,61	52,58	50,55	51,05	50,04	48,01	50,55	50,04	10,68

- 3 L= largura (em mm); A = altura (em mm); Ar = área da lesão em mm². % * = (área da lesão2 * x100 / área da lesão1 *) -100; *em que a área da lesão 2
 4 corresponde à medida atual e a área da lesão 1 corresponde à medida anterior.

5.2 Manuscrito 2

Atividade anti-*Pythium insidiosum* de compostos bioativos oriundos de plantas medicinais

Júlia de Souza Silveira Valente; Carolina Litchina Brasil; Caroline Quintana Braga; Carolina dos Santos Bermann; Ândrios da Silva Moreira; Waldenis da Trindade Júnior; Fábio Raphael Pascoti Bruhm; Sônia de Avila Botton; Daniela Isabel Brayer Pereira

Será submetido a revista Micopathology

Avaliação da atividade anti-*Pythium* de compostos bioativos oriundos de plantas medicinais

Júlia de Souza Silveira Valente^a; Carolina Litchina Brasil^a; Caroline Quinta Braga^a; Carolina dos Santos Bermann^a; Ândrios da Silva Moreira^a; Waldenis da Trindade Júnior^b; Fábio Raphael Pascoti Bruhn^a; Sônia de Avila Botton^c; Daniela Isabel Brayer Pereira^a

^a Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

^b Laboratório de Micologia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, RS, Brasil.

^c Laboratório de Pesquisas Micológicas, Centro de Ciências Rurais, Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.

*Corresponding author. Tel.: +55 53 32757338; fax: +55 53 32757338. E-mail address: danielabrayer@gmail.com (D.I.B. Pereira).

Resumo

Pythium insidiosum é o agente etiológico da pitiose, uma doença que acomete principalmente mamíferos. Alguns compostos bioativos presentes nos óleos essenciais possuem ação inibitória sobre isolados do oomiceto, sinalizando que esses compostos podem apresentar maior eficácia sobre *P. insidiosum*. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi verificar a suscetibilidade de amostras oriundas de isolados clínicos de pitiose frente aos componentes bioativos carvacrol, α -terpineol, mentol e eugenol e correlacionar com seus respectivos óleos essenciais de origem *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Eugenia caryophyllata*. Os óleos essenciais e seus componentes bioativos foram adquiridos comercialmente e os testes seguiram o protocolo padrão para testes de suscetibilidade *in vitro* adaptado. O óleo essencial que apresentou melhor atividade anti-*P. insidiosum* foi o óleo de *M. alternifolia*, para o qual as CIM variaram entre 437,75 μ g/mL e 3500 μ g/mL. O componente bioativo mais eficaz foi o α -terpineol com CIM, mais baixas que o seu óleo de origem *M. alternifolia*, variando entre 7,82-125 μ g/mL. Os compostos bioativos α -terpineol, carvacrol e eugenol tiveram ação anti-*Pythium* estatisticamente superior quando comparados aos seus óleos de origem *M. alternifolia*, *O. vulgare* e *E. caryophyllata* o que sugere que esses compostos podem ser responsáveis pela atividade inibitória desses óleos essenciais frente a *P. insidiosum*.

Abstract

Pythium insidiosum is the etiologic agent of pythiosis, a disease that mainly affects mammals. Some bioactive compounds present in essential oils have an inhibitory action on oomycete isolates, indicating that these compounds may be more effective

on *P. insidiosum*. Thus, the objective of the present study was to verify the susceptibility of samples from clinical isolates of pythiosis to the bioactive components carvacrol, α -terpineol, menthol and eugenol and correlate with their respective essential oils of origin *Origanum vulgare*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Eugenia caryophyllata*. Essential oils and their bioactive components were purchased commercially and the tests followed the standard protocol for adapted *in vitro* susceptibility tests. The essential oil that showed the best anti-*P. insidiosum* activity was *M. alternifolia* oil, for which MICs varied between 437.75 μ g / mL and 3500 μ g / mL. The most effective bioactive component was α -terpineol with MIC, lower than its oil of *M. alternifolia* origin, varying between 7.82-125 μ g / mL. The bioactive compounds α -terpineol, carvacrol and eugenol had a statistically superior anti-*Pythium* action when compared to their oils of *M. alternifolia* origin, *O. vulgare* and *E. caryophyllata*, which suggests that these compounds may be responsible for the inhibitory activity of these essential oils against *P. insidiosum*.

Inrodução

O número de infecções causadas por micro-organismos multirresistentes aos tratamentos químicos se tornou alarmante nos últimos anos. Devido a esse fato, diversos grupos de pesquisa se engajaram na busca por tratamentos alternativos para estes tipos de infecções (YU et al, 2020). Nesse sentido, uma das linhas de pesquisa de maior destaque é a que estuda a utilização de compostos naturais, com grande número de trabalhos sobre o efeito biocida dos óleos essenciais de plantas. Estes compostos possuem propriedades antimicrobianas, além de ação analgésica e anti-inflamatória, são de origem natural e podem ser obtidos sem grandes custos econômicos (PIĄTKOWSKA; RUSIECKA-ZIÓŁKOWSKA, 2016).

De acordo com Sharifi-Rad et al. (2017) os óleos essenciais são um complexo de mais de 20 componentes de baixo peso molecular com concentrações variáveis. Estes constituintes geralmente são monoterpenos ou sesquiterpenos voláteis, os quais em algumas vezes correspondem a mais de 70% da composição básica dos óleos essenciais, que quando encontrados nessa quantidade são responsáveis pelas atividades biológicas dos mesmos.

Pythium insidiosum é o agente etiológico da pitiose, uma doença emergente em regiões de clima tropical e subtropical e que acomete principalmente mamíferos (GAASTRA et al., 2010; PERMALUNG; WORASILCHAI; CHINDAMPORN, 2019).

Diferentemente da resistência fúngica e bacteriana induzida pelo uso indiscriminado de fármacos, *P. insidiosum*, um pseudo-fungo, por possuir composição química diferente dos fungos verdadeiros, apresenta muitas vezes resistência aos fármacos antimicrobianos disponíveis para o tratamento de infecções

fúngicas (MENDOZA et al., 2013). Desta forma, a fitoterapia e a utilização de compostos bioativos oriundos de plantas medicinais surgiram como uma alternativa promissora para a terapêutica da pitiose (FONSECA, 2011, FONSECA et al., 2015; ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; VALENTE et al., 2016 a, b, c; TROLEZI; AZANHA, 2017 SRIPHANA et al., 2013a; SRIPHANA et al., 2013b; SUTHIWONG et al., 2014, JESUS et al., 2015b; ZAMBRANO et al., 2019).

Entre os óleos essenciais com atividade anti-*P. insidiosum* destacam-se os estudos com *Melaleuca alternifolia*, *Origanum vulgare* e *Menta piperita* (VALENTE et al, 2016a, b, c; FONSECA et al., 2015a, b). Adicionalmente, observa-se que alguns compostos bioativos presentes nos óleos essenciais também possuem ação inibitória sobre isolados do oomiceto como é o caso do timol e carvacrol, sinalizando que os componentes majoritários podem apresentar maior atividade antimicrobiana sobre este micro-organismo (JESUS et al., 2015).

Os óleos essenciais são conhecidos por consistirem em uma mistura complexa de diversas moléculas. Segundo Bakkali et al. (2008), os estudos evidenciam atividades antimicrobianas apenas para os componentes principais de cada óleo essencial, o que induz ao questionamento se a ação dos óleos estaria na ação conjunta dos seus componentes, ou simplesmente seria resultado da ação dos seus componentes majoritários. Adicionalmente, Swamy, Akhtar e Sinniah (2016) sugerem que estes compostos ocasionam efeitos análogos aos ocasionados por óleos essenciais sobre as células microbianas, o que pode induzir uma ação antagônica entre os seus componentes.

A literatura sugere que alguns componentes dos óleos essenciais são protagonistas responsáveis pela fragrância, coloração e textura, densidade e capacidade de penetração celular, uma vez que sua característica lipofílica ou atração hidrofílica facilitam a sua distribuição e aderência às paredes e membranas celulares sendo cruciais para a distribuição do óleo na célula para exercer a ação antimicrobiana (BAKKALI et al., 2008).

O objetivo do presente estudo foi verificar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *P. insidiosum* frente aos componentes bioativos carvacrol, α -terpineol, mentol e eugenol e correlacionar com a suscetibilidade de seu respectivo óleo essencial.

Material e Métodos

Foram avaliados 25 isolados de *P. insidiosum* oriundos de equinos naturalmente infectados; uma cepa padrão de origem equina (CBS 1015.55) e oito cepas padrão de origem humana (CBS 673.85, CBS 119453, CBS 119454, CBS119455, CBS 777.84, CBS 702.83, CBS 57585 e CBS 576.85). Todos os isolados pertencem à micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas. Os isolados clínicos foram identificados por suas características macro e micromorfológicas e confirmados molecularmente conforme descrito por Azevedo et al. (2012).

O inóculo para os testes de suscetibilidade empregou cultura micelial de *P. insidiosum*, elaborado conforme descrito por Fonseca et al. (2014), diluído 1:10 em caldo RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS.

Os testes de suscetibilidade preconizaram o protocolo de microdiluição em caldo (M38-A2) do CLSI (2008) com adaptações para oomicetos. Os componentes bioativos carvacrol, α -terpineol, mentol e eugenol foram obtidos comercialmente da empresa Sigma-Aldrich Ltda. Os óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata*, *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* foram obtidos comercialmente da Ferquima Indústria e Comércio Ltda, São Paulo, Brasil. A composição química dos óleos essenciais foram previamente determinados pelo fabricante. Para a realização dos testes, os óleos essenciais foram diluídos em RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M MOPS, em concentrações que variaram de 56000 $\mu\text{g/mL}$ a 109,37 $\mu\text{g/mL}$. Os componentes bioativos foram diluídos em metanol e testados nas concentrações de 2.800 a 5,47 $\mu\text{g/mL}$ para o carvacrol, de 1000 a 1,95 $\mu\text{g/mL}$ para o terpineol, 100.000 a 195,3 para o mentol e 85850 a 167,68 para o eugenol. As placas foram incubadas sob agitação de 40 RPM a 37°C por 48 horas. A leitura foi visual e levou em consideração o crescimento ou não de hifas. A menor concentração dos compostos capaz de inibir o crescimento de *P. insidiosum* foi identificada como concentração inibitória mínima (CIM). As concentrações capazes de inibir 50% e 90% dos isolados foram denominadas CIM₅₀ e CIM₉₀, respectivamente. As concentrações acima da CIM foram utilizadas para a determinação da concentração oomicida mínima (COM). Para isso 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 princípio ativo que não evidenciou crescimento foi considerada a COM.

Análise estatística

Para comparar a CIM dos óleos essenciais em relação aos seus componentes majoritários, inicialmente foram aplicados testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. Uma vez observada a ausência de distribuição normal, os dados foram descritos por meio da mediana e sua distância interquartilica, sendo as comparações realizadas por meio de testes não paramétricos de Wilcoxon. Considerou-se um nível mínimo de confiança de 95% ($p < 0,05$) em todas as análises estatísticas. O software estatístico SPSS 20.0 foi usado na realização das análises.

Resultados

Os resultados da suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* ($n=34$) frente aos óleos essenciais e seus respectivos compostos majoritários estão demonstrados na Tabela 1. O óleo essencial que apresentou melhor atividade anti-*P. insidiosum* foi o óleo de *M. alternifolia*, para o qual as CIM variaram entre 437,75 $\mu\text{g/mL}$ e 3500 $\mu\text{g/mL}$. Por sua vez, o componente bioativo com maior atividade antimicrobiana foi o α -terpineol evidenciando CIM variando entre 7,82 $\mu\text{g/mL}$ a 125,12 $\mu\text{g/mL}$, com CIM₅₀ de 15,64 $\mu\text{g/mL}$ e CIM₉₀ de 125,12. Com exceção do α -terpineol, que diferiu em quatro amostras e do carvacrol em duas, as COM evidenciaram os mesmos valores das CIM.

Observou-se que os isolados de *P. insidiosum* de origem humana evidenciaram valores de CIM maiores que os isolados de origem equina.

Ao comparar os valores das CIM dos óleos essenciais de *Eugenia caryophyllata*, *M. alternifolia*, *M. piperita* e *O. vulgare* com os valores de CIM dos seus respectivos componentes majoritários eugenol, α -terpineol, mentol e carvacrol, constatou-se que com exceção do mentol, que evidenciou CIM₅₀ e CIM₉₀ com maiores valores que o óleo essencial de *M. piperita* ($p=0,590$), os componentes majoritários de cada óleo tiveram atividade anti-*P. insidiosum* superior ao seu óleo de origem com $p=0,000$ para o α -terpineol em relação à *M. alternifolia* e $p=0,024$ para o eugenol com relação à *E. caryophyllata*. Destaca-se a atividade do α -terpineol que demonstrou CIM₅₀ e CIM₉₀ de aproximadamente 55 e 28 vezes menor, respectivamente, do que a CIM₅₀ e CIM₉₀ de seu óleo essencial de origem, *M. alternifolia*.

Discussão

A pitiose afeta mamíferos, sendo os equinos, caninos e humanos as espécies onde a doença se manifesta mais frequentemente (GAASTRA et al., 2010). Independente do protocolo terapêutico adotado, incluindo cirurgia, imunoterapia ou administração de fármacos, relata-se em todas as espécies infectadas por *P. insidiosum*, dificuldades no tratamento e cura da enfermidade (GAASTRA et al., 2010). Algumas características particulares deste oomiceto, como a ausência de ergosterol na membrana citoplasmática, justificam a baixa responsividade de *P. insidiosum* aos protocolos terapêuticos empregando fármacos antifúngicos como anfotericina B, azólicos (ARGENTA et al., 2012; JESUS et al., 2015). Desta forma, na última década a fitoterapia tem se destacado como uma nova linha de pesquisa no combate a *P. insidiosum* e estudos demonstram que óleos essenciais de plantas medicinais possuem ação letal sobre esse micro-organismo e podem representar uma boa alternativa no tratamento da pitiose (FONSECA et al., 2015a, b; ARAUJO; BOSCO; SFORCIN, 2016; VALENTE et al., 2016 a, b, c; TROLEZI; AZANHA, 2017; JESUS et al., 2015b; ZAMBRANO et al., 2019).

Previamente, nosso grupo de pesquisa relatou atividade anti-*Pythium insidiosum* dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *M. piperita* e *M. alternifolia*, (FONSECA et al., 2015a, b; VALENTE et al, 2016a, b, c), bem como do óleo de girassol ozonizado (ZAMBRANO et al., 2019).

Alguns componentes majoritários dos óleos essenciais possuem propriedades antimicrobianas reconhecidas, sendo muitos apontados como os principais responsáveis pelas propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais (HUSSAIN et al., 2011; FONSECA et al., 2015; TYAGI; MALIK, 2011; BROPHY et al., 1989). Em alguns casos tem-se observado que os constituintes majoritários apresentaram melhor atividade sobre determinados micro-organismos do que o próprio óleo essencial de origem (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Segundo Sharifi-Rad et al. (2018) os compostos naturais apresentam alto potencial para a formulação de moléculas sintéticas para o tratamento de infecções resistentes.

O α -terpineol é um dos componentes majoritários do óleo de *M. alternifolia* e é apontado em alguns estudos, como um dos principais responsáveis pela atividade antibacteriana do óleo de *M. alternifolia* (CARSON; RYLEY, 1998; CARSON; RYLEY, 2002; CARSON; HAMMER; RYLEY, 2006). Em nosso estudo, os valores de

CIM observados para *P. insidiosum* frente ao α -terpineol variaram entre 7,82 a 125,12 $\mu\text{g/mL}$ e com CIM em valores superiores, variando entre 437,75 e 3500 $\mu\text{g/mL}$, para *M. alternifolia*. Previamente, Valente et al. (2016a) demonstraram a ação de *M. alternifolia* sobre amostras de *P. insidiosum* observando concentrações de CIM similares às encontradas para o mesmo óleo no presente estudo e superiores às observadas para o α -terpineol. Park et al. (2012) descreveram o uso de α -terpineol para a formulação de cremes dentais para o tratamento de periodontite. Ao comparar diversos componentes bioativos de óleos essenciais, esses autores observaram uma atividade antibacteriana inferior para este composto quando comparada ao linalol, um monoterpeno originário do óleo essencial de *Aniba duckei*. Badaway et al., (2019) ao comparar diversos compostos hidrocarbonetos e monoterpenos, encontraram melhor atividade antioxidante e antimicrobiana do α -terpineol obtendo CIM de 55 $\mu\text{g/mL}$ e 225 $\mu\text{g/mL}$ contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente. Entretanto estes autores observaram que este composto apresentou menor atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* com CIM de 407 $\mu\text{g/mL}$.

O carvacrol é um monoterpeno fenólico isolado do óleo essencial de *O. vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Lepidium flavum* e *Citrus aurantium* var. *bergamia* entre outras plantas (SHARIFI-RAD, et al., 2018). As propriedades desse composto incluem atividade antibacteriana e antifúngica (CHAVAN; TUPE, 2014; NOSTRO et al., 2012), antiviral (GILLING et al., 2014; Sánchez et al., 2015), antioxidante (GUIMARÃES et al., 2010; MILOS et al., 2012) e anticarcinogênicas (ARUNASREE, 2010; Ozkan; Erdogan, 2011; YIN et al., 2012). No presente estudo observou-se que o carvacrol apresentou atividade anti-*P. insidiosum* superior ao óleo de *O. vulgare*. Estudos prévios demonstraram a atividade de *O. vulgare* em CIM similares às observadas no presente estudo (FONSECA et al., 2015a; VALENTE et al., 2016(a, b, c), porém em valores maiores quando comparadas ao carvacrol. Jesus et al. (2015b) comprovaram a atividade anti-*P. insidiosum* de carvacrol, com CIM muito similares às observadas nesta pesquisa.

Os resultados observados para o carvacrol corroboram com os achados de Arfa et al. (2006), os quais compararam a atividade antimicrobiana de carvacrol, eugenol, mentol e dois compostos derivados sintetizados de carvacrol, contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* e *Bacillus subtilis*; *Saccharomyces cerevisiae* e *Botrytis cinerea*. Os

autores constataram melhor atividade antimicrobiana do carvacrol, com CIM variando entre 250 $\mu\text{g/mL}$ a 1000 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo que esta atividade ocorreu devido ao fato de o carvacrol ser com composto mais hidrofóbico entre os testados, o que permite melhor acúmulo desse composto na membrana celular. De acordo com esse grupo de pesquisadores, sua capacidade de ligação com hidrogênio e sua capacidade de liberação de prótons são capazes de induzir modificações na morfologia da membrana, resultando em morte celular do micro-organismo. Adicionalmente Abbaszadeh et al. (2014), constataram a atividade de timol, carvacrol, eugenol e mentol sobre 11 diferentes fungos, observando maior atividade antifúngica de carvacrol, entretanto os valores encontrados para a CIM foram elevados, com concentração de 100000 $\mu\text{g/mL}$ para *Aspergillus* spp. e *Cladosporium* spp.

O mentol é um composto fenólico extraído do óleo essencial de *M. piperita*. Esse composto possui propriedades antimicrobianas bastante conhecidas e é citado como um dos componentes responsáveis pela característica antimicrobiana desse óleo. Suas aplicações são diversas incluindo a inibição da formação de biofilme em *Candida albicans* (BENZAID et al., 2019) e ação analgésica e sedativa para manuseio de peixes (SEPULCHRO et al., 2016). Adicionalmente, esse composto pode atuar como antimicrobiano contra bactérias (TURCHENIUK et al., 2015; KIFER et al., 2016) e fungos (ABBAZADEH et al., 2014; MOGHTADER, 2013). Os valores de CIM encontradas para o mentol foram estatisticamente superiores aos observados para o óleo de *M. piperita* o que sugere que o óleo possa ter sinergismo na interação entre seus componentes sobre os isolados de *P. insidiosum*. Entretanto as CIM observadas para o óleo de *M. piperita* foram similares às constatadas por Fonseca et al., (2015^a) e Valente et al., (2015b, c). A menor atividade inibitória encontrada para este composto sobre *P. insidiosum* também foi constatada por Badaway et al. (2019) ao comparar a atividade antimicrobiana de hidrocarbonetos e monoterpenos contra micro-organismos com CIM de 275 $\mu\text{g/mL}$ contra *E. coli* e 400 $\mu\text{g/mL}$ contra *S. aureus* e 304 $\mu\text{g/mL}$ contra *A. flavus*.

O eugenol é um composto aromático que está presente no óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*. Esse composto possui características antimicrobianas comprovadas sobre bactérias (DEVI et al, 2010; CHEN et al, 2009), fungos (CHAMI et al. 2004; CHENG, 2008; ABBAZADEH et al., 2014) e vírus (ORHAN, 2009; TRAGOOLPUA; JATISATIENR, 2007). Abbaszadeh et al. (2014), ao testarem a

atividade de eugenol sobre várias espécies de fungos ambientais como *Aspergillus* spp., *Alternaria* spp., *Penicillium* spp. *Cladosporium* sp., *Rhizopus* sp. e *Botrytis* encontraram CIM similares à CIM₅₀ e CIM₉₀ (350 µg/mL e 500 µg/mL) observada para esse composto no presente estudo. Adicionalmente, as CIM observadas para este composto foram estatisticamente inferiores às constatadas para o óleo de *E. caryophyllata*, o que nos leva a inferir que a atividade anti-*P. insidiosum* deste óleo essencial possa ser protagonizada pela presença do eugenol.

O mecanismo de ação dos componentes majoritários dos óleos essenciais ainda não está completamente elucidado. Entretanto, Swamy, Akhtar e Sinniah (2016) sugerem que estes compostos possuem uma ação similar à dos óleos essenciais induzindo a apoptose através de uma série de danos irreversíveis à membrana da célula microbiana que incluem a alteração da permeabilidade que compromete o potencial de membrana e desintegração das membranas mitocondriais, levando ao prejuízo da produção de ATP e causando a morte da célula microbiana.

Conclusão

Os compostos bioativos oriundos de plantas medicinais são capazes de inibir o crescimento de *P. insidiosum*. A atividade anti-*P. insidiosum* dos compostos α -terpinol, carvacrol e eugenol foram superiores quando comparadas aos seus óleos de origem *M. alternifolia*, *O. vulgare* e *Eugenia caryophyllata* respectivamente. Esses resultados permitem inferir que a utilização do óleo essencial de *M. alternifolia* e *Origanum vulgare*, ou de seus componentes bioativos α -terpineol e carvacrol, respectivamente, podem ser responsáveis por grande parte da ação oomicida destes compostos.

Referências

ABBASZADEHA, S.; SHARIFZADEHB, A.; SHOKRIC, H.; KHOSRAVIB, A.R.; ABBASZADEHL, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Medical Micology**, v24, n.2, p.e51-e56, 2014.

1 ARAUJO, M.J.A.M.; BOSCO, S.M.G.; SFORCIN, J.M. *Pythium insidiosum*: inhibitory
2 effects of propolis and geopropolis on hyphal growth. **Brazilian Journal of**
3 **Microbiology**, v.47, n.4, p.863-869, 2016.

4
5 ARFA, A.B.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOU, L.; GONTARD, N.; CHALIER, P.
6 Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied**
7 **Microbiology**, v.43, n.2, p.149–154, 2006.

8
9 BROPHY, J.J.; DAVIES, N.W.; SOUTHWELL, I.A.; STIFF, I.A.; LYALL R. WILLIAMS,
10 L.R. Gas chromatographic quality control for oil of *Melaleuca terpinen-4-ol* type
11 (Australian tea tree). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.37, n.5,
12 p.1330-1335, 1989.

13
14 CHEN, F.; ZHILONG, S.; NEO, K.G.; KANG, E.T. Antioxidant and Antibacterial
15 Activities of Eugenol and Carvacrol-Grafted Chitosan Nanoparticles. **Biotechnology**
16 **and Bioengineering**, v.104, n.1, p.30-39, 2009.

17
18 FONSECA, A.O.; BOTTON, S.A.; NOGUEIRA, C.E.; CORRÊA, B.F.; SILVEIRA, J.S.;
19 DE AZEVEDO, M.I.; MARONEZE, B.P.; SANTURIO, J.M.; PEREIRA, D.I.B. *In vitro*
20 reproduction of the life cycle of *Pythium insidiosum* from "kunkers" equine and their role
21 in the epidemiology of pythiosis. **Mycopathologia**, v.177, n.1-2, p.123-127, 2014a.

22
23 FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; MAIA FILHO, F.; OSÓRIO, L.G.; MARONEZE,
24 B.P.; VALENTE, J.S.; PÖTTER, L.; MEIRELES, M.C. *In vitro* susceptibility of
25 zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of**
26 **Antimicrobial Chemotherapy**. v. 69, n.6, p.1564-1567, 2014b.

27
28 FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; JACOB, R.G.; MAIA FILHO, F.S.; OLIVEIRA, D.H.;
29 MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.; OSÓRIO, L.G.; BOTTON, S.A.; MEIRELES,
30 M.C. *In vitro* susceptibility of Brazilian *Pythium insidiosum* isolates to essential oils of
31 some Lamiaceae family species. **Micopathologia**. v.179, n.3-4, p.253-258, 2015a.

FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; BOTTON, S.A.; PÖTTER, L.; SALLIS, E.S.; JÚNIOR, S.F.; FILHO, F.S.; ZAMBRANO, C.G.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.; BAPTISTA, C.T.; BRAGA, C.Q.; BEM, V.D.; MEIRELES, M.C. 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, 2015b.

HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; RASHEED, S.; NIGAM, P.S.; JANNEH, O.; SARKER, S.D. 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, 2011.

JESUS, F.P.; FERREIRO, L.; BIZZI, K.S.; LORETO, É.S.; PILOTTO, M.B.; LUDWIG, A.; ALVES, S.H.; ZANETTE, R.A.; SANTURIO, J.M. *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, 2015b.

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

PARK, S.N.; LIM, Y.K.; FREIRE, M.O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J.K. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v.18, n.3, p.369-372, 2012.

PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; CHINDAMPORN, A. Human Pythiosis: Emergence of Fungal-Like Organism. **Mycopathologia**, 2019.

PIĄTKOWSKA, E.; RUSIECKA-ZIÓŁKOWSKA, J. Influence of essential oils on infectious agents. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v.25, p.989–995, 2016.

RAUT, J.S.; KARUPPAYIL, S.M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v.62, p 250–264, 2014.

SHARIFI-RAD, J.; SUREDA, A.; TENORE, G.C.; DAGLIA, M.; SHARIFI-RAD, M.; VALUSSI, M.; TUNDIS, R.; SHARIFI-RAD, M.; LOIZZO, M.R.; ADEMILUYI, A.O.; SHARIFI-RAD, R.; AYATOLLAHI, S.A.; IRITI, M. Biological Activities of Essential Oils: From Plant Chemoecology to Traditional Healing Systems. **Molecules**, v.1, p.22, 2017.

SOUZA, D.P. Evolution of the Anticonvulsant Activity of α -Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.1, p. 1744-5116, 2007.

SRIPHANA, U.; THONGSRI, Y.; ARDWICHAI, P.; POOPASIT, K.; PRARIYACHATIGUL, C.; SIMASATHIANSOPHON, S.; YENJAI, C. New ligman esters from *Alyxia schlechteri* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Fitoterapia**, v.91, p.39-43, 2013a.

SRIPHANA, U.; THONGSRI, Y.; PRARIYACHATIGUL, C.; PAKAWATCHAI, C.; YENJAI, C. Clauralia e from the roots of *Clausena harmandiana* and antifungal activity against *Pythium insidiosum*. **Archives of Pharmacal Research**, v.36, p.1078-1083, 2013b.

SUTHIWONG, J.; SRIPHANA, U.; THONGSRI, Y.; PROMSUWAN, P.; PRARIYACHATIGUL, C.; YENJAI, C. Coumarinoid from the fruits of *Micromelum facatum*. **Fitoterapia**, v.94, p.134-141, 2014.

TROLEZI, R.; AZANHA, J.M.; PASCHOAL, N.R.; CHECHI, J.L.; SILVA, M.J.D.; FABRIS, V.E.; VILEGAS, W.; KANENO, R.; FERNANDES JUNIOR, A.; BOSCO, S.M.B. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobial**, v.1, p.1-7, 2017.

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.

1 VALENTE J.S.S.; FONSECA, A.O.; BRASIL, C.L.; SAGAVE, L.; FLORES, F.C.;
2 SILVA, C.B.; SANGIONI, L.A.; PÖTTER, L.; SANTURIO, J.M.; BOTTON, S.A.;
3 PEREIRA, D.I.B. *In vitro* Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil
4 and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. . **Mycopathologia**,
5 v.181, n.(11-12), p.865-869, 2016a.

6
7 VALENTE J.S.S.; FONSECA, A.O.; DENARDI, L.B.; DAL BEM, V.S.; MAIA FILHO,
8 F.S.; BAPTISTA, C.T.; BRAGA, C.Q.; ZAMBRANO, C.G.; ALVES, S.H.; BOTTON,
9 S.A.; PEREIRA, D.I.B. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca*
10 *alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations.
11 **Mycopathologia**, v.181, n.5-6, 2016b.

12
13 VALENTE, J.S.S.; FONSECA, A.O.; DENARDI, L.B.; DAL BEM, V.S.; MAIA FILHO,
14 F.S.; ZAMBRANO, C.G.; BRAGA, C.Q.; ALVES, S.H.; BOTTON, S.A.; BRAYER
15 PEREIRA, D.I. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against
16 the oomycete *Pythium insidiosum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, n.4,
17 p.998-1003, 2016c.

18
19 YU, Z.; TANG, J.; KHARE, T.; KUMAR, V. The Alarming Antimicrobial Resistance in
20 ESKAPEE Pathogens: Can Essential Oils Come to the Rescue? **Fitoterapia**, v.140,
21 104433, 2020.

1 **Tabela 1:** Variação de CIM, CIM₅₀ e CIM₉₀ dos óleos essenciais *Eugenia caryophyllata*, *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* e
 2 seus respectivos componentes majoritários eugenol, α-terpineol, mentol e carvacrol frente a isolados de *P. insidiosum* (n=34).

Óleo essencial	Variação de CIM (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)	Componente majoritário	Variação de CIM (µg/mL)	CIM ₅₀ (µg/mL)	CIM ₉₀ (µg/mL)
<i>Eugenia caryophyllata</i> .	109,37-35000	437,75	1750	Eugenol ^b	335,35-385,63	600,7	1341,4
<i>Melaleuca alternifolia</i>	437,75-3500 ^a	875	3500	α-terpineol ^b	7,82-125,12	15,64	125,12
<i>Mentha piperita</i>	109,37-28000 ^a	1750	28000	Menthol ^a	1562,5-12500	31225	6250
<i>Origanum vulgare</i>	109,37-3500 ^a	875	3500	Carvacrol ^b	21,88-700	43,75	1341,4

3 ^a Concentração inibitória mínima capaz de inibir 50 % dos isolados.

4 ^b Concentração inibitória mínima capaz de inibir 90 % dos isolados.

5 Letras iguais na mesma linha significa que não diferiram significativamente entre óleo e composto majoritário (p < 0,05).

6 Conclusões Gerais

- A suscetibilidade dos isolados de *P. insidiosum* frente à bioAgNP nos testes *in vitro*, mostra que são capazes de ocasionar danos celulares às hifas desse patógeno em baixas concentrações. Adicionalmente, a capacidade de redução das lesões da pitiose experimental pela utilização desses compostos demonstra o potencial promissor de sua utilização no tratamento da pitiose.

- A nanoemulsão de *M. alternifolia* intralesão é capaz de reduzir as lesões de pitiose cutânea dos animais infectados experimentalmente.

- A atividade anti-*P. insidiosum* dos componentes majoritários α -terpineol e carvacrol é superior aos seus óleos essenciais de origem *M. alternifolia* e *Origanum vulgare*, respectivamente, sugerindo que esses compostos são responsáveis por grande parte da ação oomicida do óleo essencial.

- Os resultados do presente estudo permitem inferir que as nanopartículas biogênicas de prata, bem como os óleos essenciais e seus compostos majoritários podem se constituir em importantes aliados da terapêutica da pitiose ampliando as perspectivas para o desenvolvimento de novos medicamentos com atividade efetiva sobre *P. insidiosum*.

Referências

- ABBASZADEHA, S.; SHARIFZADEHB, A.; SHOKRIC, H.; KHOSRAVIB, A.R.; ABBASZADEHL, A. Antifungal efficacy of thymol, carvacrol, eugenol and menthol as alternative agents to control the growth of food-relevant fungi. **Medical Micology**, v24, n.2, p.e51-e56, 2014.
- ARAUJO, M.J.A.M.; BOSCO, S.M.G.; SFORCIN, J.M. *Pythium insidiosum*: inhibitory effects of propolis and geopropolis on hyfal growth. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.47, n.4, p.863-869, 2016.
- ARGENTA, J.S.; ALVES, S.H.; SILVEIRA, F.; MABONI, G.; PEREIRA, D.I.; SPANAMBERG, A.; SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. *In vitro* paradoxical growth of *Pythium insidiosum* in the presence of caspofungin. **Veterinary Microbiology**, v.145 n.3-4, p.321-323, 2010.
- ARGENTA, J.S.; ALVES, S.H.; SILVEIRA, F.; MABONI, G.; ZANETTE, R.A.; CAVALHEIRO, A.S.; PEREIRA, P.L.; PEREIRA, D.I.; SALLIS, E.S.; PÖTTER, L.; SANTURIO, J.M.; 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*. **Veterinary Microbiology**, v.157, p.137-142, 2012.
- BAGGA, B.; SHARMA, S.; GUDA, S.J.M.; NAGPAL, R.; JOSEPH, J.; MANJULATHA, K.; MOHAMED, A.; GARG, P. Leap forward in the treatment of *Pythium insidiosum* keratitis. **British Journal of Ophthalmology**, v.102, n.12, p. 1629-1633, 2018.
- BAKKALI, F. Biologicaleffects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446–475, 2008.
- BENZAID, C.; BELMADANI, A.; DJERIBI, R.; ROUABHIA, M. The Effects of *Mentha piperita* Essential Oil on *C. albicans* Growth, Transition, Biofilm Formation, and the Expression of Secreted Aspartyl Proteinases Genes. **Antibiotics (Basel)**, v.8, n.1, 2019.
- BOCATE, K.P.; REISA, G.F.; SOUZA, P.C.; OLIVEIRA JUNIOR, A.G.; DURÁN, N.; NAKAZATO, G.; FURLANETO, M.C.; ALMEIDA, R.S.; PANAGIO, L.A. Antifungal activity of silver nanoparticles and simvastatin against toxigenic species of *Aspergillus*. **International Journal of Food Microbiology** v.291, n.16, p.79–86, 2019.
- 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 Chemoterapy**, v.46, n.6, p.1914-1920, 2002.
- CHAMI, N.; CHAMI, F.; BENNIS, S.; TROUILLAS, J.; REMMAL, A. Antifungal treatment with carvacrol and eugenol of oral candidiasis in immunosuppressed rats. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v.8, n.3, p.1678-4391, 2004.

- CHATTERJEE, S.; AGRAWAL, D. Azitromycin in the management of *Pythium insidiosum* keratitis. **Cornea**, v.37, n.2, p. e8-e9, 2018.
- CHAVAN, P.S.; TUPE, S.G. Antifungal activity and mechanism of action of carvacrol and thymol against vineyard and wine spoilage yeasts. **Food Control**, v.46, p.115–120, 2014.
- CHEN, F.; SHI, Z.; NEOH, K.G.; KANG, E.T. Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. **Biotechnology and bioengineering**, v.104, n.1, p.30-39, 2009.
- CHENG, S.S.; LIU, J.Y.; CHANG, E.H.; CHANG, S.T. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. **Bioresource Technology**, v.99, n.11, p.5145-5149, 2008.
- CHITASOMBAT, M.N.; PETCHKUM, P.; HORSIRIMANONT, S.; SORNMAIYURA, P.; CHINDAMPORN, A.; KRAJAEJUN, T. Vascular pythiosis of carotid artery with meningitis and cerebral septic emboli: A case report and literature review. **Medical Mycology Case Reports**, v.21, p.57-62, 2018.
- DE COCK, A.W.; MENDOZA, L.; PADHYE, A.A.; AJELLO, L.; KAUFMAN, L. *Pythium insidiosum* sp. nov., the etiologic agent of 2233 pythiosis. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 25, n. 2, p. 344-349, feb.1987.
- DEVI, K.P.; NISHA, S.A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S.K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v.130, n.1, p.107-115, 2010.
- DOWST, M.; DOWST, M.; PAVUK, A.; VILELA, R.; VILELA, C.; MENDOZA, L. An unusual case of cutaneous feline pythiosis. **Medical Mycology Case Repots**, v.26, p.57-60, 2019.
- DYKSTRA, M.J.; SHARP, N.J.; OLIVRY, T.; HILLIER, A.; MURPHY, K.M.; KAUFMAN, L.; KUNKLE, G.A.; PUCHEU-HASTON, C. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Medical Mycology**, v.37, n.6, p.427-433, 1999.
- FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; MAIA FILHO, F.; OSÓRIO, L.G.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.; PÖTTER, L.; MEIRELES, M.C. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 69, n.6, p.1564-1567, 2014a.
- FONSECA, A.O.; BOTTON, S.A.; NOGUEIRA, C.E.; CORRÊA, B.F.; SILVEIRA, J.S.; DE AZEVEDO, M.I.; MARONEZE, B.P.; SANTURIO, J.M.; PEREIRA, D.I.B. *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, 2014b.

- FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; JACOB, R.G.; MAIA FILHO, F.S.; OLIVEIRA, D.H.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.; OSÓRIO, L.G.; BOTTON, S.A.; MEIRELES, M.C. *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, 2015a.
- FORTIN, J. S. Sublingual pythiosis in a cat. **Acta Veterinaria Scandinavica**, v.59, n.63, p.1-5, 2017.
- FONSECA, A.O.; PEREIRA, D.I.; BOTTON, S.A.; PÖTTER, L.; SALLIS, E.S.; JÚNIOR, S.F.; FILHO, F.S.; ZAMBRANO, C.G.; MARONEZE, B.P.; VALENTE, J.S.; BAPTISTA, C.T.; BRAGA, C.Q.; BEM, V.D.; MEIRELES, M.C. 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, 2015b.
- GAASTRA, W.; LIPMAN, L.J.; DE COCK, A.W.; EXEL, T.K.; PEGGE, R.B.; SCHEURWATER, J.; VILELA, R.; MENDOZA, L. *Pythium insidiosum*: an overview. **Veterinary Microbiology**, v.146, p.1–16, 2010.
- GILLING, D.H.; KITAJIMA, M.; TORREY, J.R.; BRIGHT, K.R. Antiviral efficacy and mechanisms of action of oregano essential oil and its primary component carvacrol against murine norovirus. **Journal of Applied Microbiology**, v.116, n.5, p.1149–1163, 2014.
- GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.C.; ARAÚJO, A.A.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay guided evaluation of antioxidant and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.107, n.6, p. 949–957, 2010.
- HILTON, R.E.; TEPEDINO, K.; GLENN, C.J.; MERKEL, K.L. Swamp cancer: a case of human pythiosis and review of the literature. **British Journal of Dermatology**, v.175, p. 394-397, 2016.
- HUDSPETH, D.S.S.; NADLER, S.A.; HUDSPETH, M.E.S. A COX2 molecular phylogeny of the peronosporomycetes. **Mycologia**, v.92, n.4, p.674-684, 2000.
- INGLE, A.P.; DURAN, N.; RAI, M. Bioactivity, mechanism of action, and cytotoxicity of copper-based nanoparticles: A review. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.98, p.1001-1009, 2014.
- ITAQUI, S.R.; VERDI, C.M.; TONDOLO, J.S.; DA LUZ, T.S.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M.; LORETO, É.S. *In vitro* synergim between azithromycin or terbinafine and tropical antimicrobial agents against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.8, p. 5023-5025, 2016.
- JAEGER, G.H. Prostatic Pythiosis in a Dog. **Journal of Veterinary Internal Medicine**, v.16, n.5, p.598-602, 2002.

- JESUS, F.P. *In vitro* and *in vivo* antimicrobial activities of minocycline in combination with azithromycin, clarithromycin, or tigecycline against *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, n.1, p.87-91, 2016.
- JESUS, F.P.; FERREIRO, L.; BIZZI, K.S.; LORETO, É.S.; PILOTTO, M.B.; LUDWIG, A.; ALVES, S.H.; ZANETTE, R.A.; SANTURIO, J.M. *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. 2015.
- KONG, Q.; ZHANG, L.; AN, P.; QI, J.; YU, X.; LU, J.; REN, X. Antifungal mechanisms of α -terpineol and terpene-4-alcohol as the critical components of *Melaleuca alternifolia* oil in the inhibition of rot disease caused by *Aspergillus ochraceus* in postharvest grapes. **Journal of Applied Microbiology**, v.126, p.1161—1174, 2019.
- KONRADT, G. Cutaneous Pythiosis in calves: An epidemiologic, pathologic, serologic and molecular characterization. **Medical Mycology Case Reports**, v.14, p.24-26, 2016.
- KRAJAEJUN, T.; LOHNOO, T.; JITTORNTAM, P.; SRIMONGKOL, A.; KUMSANG, Y.; YINGYONG, W.; RUJIRAWAT, T.; REAMTONG, O.; MANGMEE, S. Assessment of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification and biotyping of the pathogenic oomycete *Pythium insidiosum*. **International Journal of Infectious Diseases**, v.77, p.61-67, 2018.
- LEAL, A.B.M.; LEAL, A.T.; SANTURIO, J.M.; KOMMERS, G.D.; CATTO, J.B. Pitiose equina no pantanal brasileiro: Aspectos clínico-patológico de casos típicos e atípicos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.21, n.4, p.151-156, 2001.
- LERKSUTHIRAT, T.; SANGCAKUL, A.; LOHNOO, T.; YINGYONG, W.; RUJIRAWAT, T.; KRAJAEJUN, T. Evolution of the Sterol Biosynthetic Pathway of the Sterol Biosynthetic Pathway of *Pythium insidiosum* and Related Oomycetes Contributes to Antifungal Drug Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemother.** n. 4, p 1-37, 2017.
- LIAO, M.; YANG, Q.; XIAO, J.; HUANG, Y.; ZHOU, L.; HUA, R.; CAO, H. Toxicity of *Melaleuca alternifolia* essential oil to the mitochondrion and NAD⁺/NADH dehydrogenase in *Tribolium confusum*. **Peer J**, v.13, n.6, p.e5693, 2018.
- LORETO, E.S.; MARIO, D.A.; DENARDI, L.B.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to macrolides and tetracycline antibiotics. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.55, n.7, p.3588-3590, 2011.
- LORETO, E.S.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Diphenyl diselenide *in vitro* and *in vivo* activity against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Veterinary Microbiology**, v.156, n.1-2, p. 222-226, 2012.
- LORETO, E.S.; TONDOLO, J.S.; PILOTTO, M.B.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. New Insights into the *In Vitro* Susceptibility of *Pythium insidiosum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 7534 -7537, 2014.

LORETO, E.S.; TONDOLO, J.S.M.; OLIVEIRA, D.C.; SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H. *In vitro* activities of miltefosine and antibacterial agents from the macrolide, oxazolidinone and pleuromutilin classes against *Pythium insidiosum* and *Pythium aphanidermatum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.62, n.3, p.1678-1717, 2018a.

LORETO, E.S. Suscetibilidade in vitro e in vivo de *Pythium insidiosum* frente a antibacterianos (macrolídeos, oxazolidinonas e pleuromutilinas) em miltefosina 2018.125f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2018b.

LORETO, E.S.; TONDOLO, J.S.M.; JESUS, F.P.K.; ENGELMANN, A.M.; ANDRADE, C.M.; SANTURIO, J.M.; ZANETTE, R.A.; KOMMERS, G.D.; SILVA, T.M.; ALVES, S.H. Efficacy of miltefosine therapy against subcutaneous experimental pythiosis in rabbits. **Journal de Mycologie Médicale**, 2019.

MACHADO, G. Potential distribution of *Pythium insidiosum* in Rio Grande do Sul, Brazil, and projections to neighbour countries. **Transboundary and Emerging Diseases**, v.65, n.6, p.1671-1679, 2018.

MARCOLONGO-PEREIRA, C.; SALLIS, E.S.V.; RAFI, M.B.; PEREIRA, D.I.B.; HINNAH, F.L.; COELHO, A.C.B.; SCHILD, A.L. Epidemiologia da pitiose equina na Região Sul do Rio Grande do Sul. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v.32, p.865-868, 2012.

MENDOZA, L.; ARIAS, M.; COLMENAREZ, V.; PERAZZO, Y. Intestinal canine pythiosis in Venezuela confirmed by serological and sequencing analysis. **Mycopathologia**. v. 159, p. 219-222, 2005.

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 2542 pathogenic for horses in Australia. **Mycopatologia**, v.81, p. 23-28, 1983.

MILOS, M.; MAKOTA, D. Investigation of antioxidant synergisms and antagonisms among thymol, carvacrol, thymoquinone and p-cymene in a model system using the Briggs–Rauscher oscillating reaction. **Food Chemistry**, v.131, n.1, p.296–299, 2012.

MOGHTADER, M. *In vitro* antifungal effects of the essential oil of *Mentha piperita* L. and its comparison with synthetic menthol on *Aspergillus niger*. **African Journal of Plant Science**, v.7, n.11, p. 521-527, 2013.

NOSTRO, A.; PAPALIA, T. Antimicrobial Activity of Carvacrol: Current Progress and Future Prospectives. **Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery**, v.7, n.1, p.28-35, 2012.

ORHAN, I.E.; ÖZÇELİK, B.; KARTAL, M.; KAN, Y. Antimicrobial and antiviral effects of essential oils from selected Umbelliferae and Labiatae plants and individual essential oil components. **Turkish Journal of Biology**, v.36, p.239-246, 2012.

PARK, S.N.; LIM, Y.K.; FREIRE, M.O.; CHO, E.; JIN, D.; KOOK, J.K. Antimicrobial effect of linalool and α -terpineol against periodontopathic and cariogenic bacteria. **Anaerobe**, v.18, n.3, p.369-372, 2012.

PAVARINI, S.P. et al. Diagnóstico imunistoquímico de pitiose intestinal em um canino. In: ENCONTRO NACIONAL DE PATOLOGIA VETERINÁRIA, XIII, 2007, Campo Grande. **Anais do Congresso**, Campo Grande: Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia/UFMS, 2007, p. 149-150. CD ROOM.

PEREIRA D.I.B, BOTTON, S.A.; AZEVEDO, M.I.; MOTTA, M.A.; LOBO, R.R.; SOARES, M.P.; FONSECA, A.O.; JESUS, F.P.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. Canine gastrointestinal pythiosis treatment by combined antifungal and immunotherapy and review of published studies. **Mycopathologia**, v.176, p.309–315, 2013.

PERMPALUNG, N.; WORASILCHAI, N.; MANOTHUMMETHA, K.; TORVORAPANIT, P.; RATANAWONGPHAIBUL, K.; CHULEERARUX, N.; PLONGLA, R.; CHINDAMPORN, A. Clinical outcomes in ocular pythiosis patients treated with a combination therapy protocol in Thailand: A prospective study. **Medical Mycology**, v.57, n.8, p.923-928, 2019.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v.27, p.76-83, 2009.

RAMADAN, M.A.; SHAWKEY, A.E.; RABEH, M.A.; ABDELLATIF, A.O. Expression of P53, BAX, and BCL-2 in Human Malignant Melanoma and Squamous Cell Carcinoma Cells After Tea Tree Oil Treatment *in vitro*. **Journal of Applied Microbiology**, v.124, n.4, p.1161-1174, 2019.

RATHI, A.M.D. *Pythium* Keratitis Leading to Fatal Cavernous Sinus Thrombophlebitis. **Cornea**, v.0, n.0, p.1-4, 2018.

REAGAN, K.L.; MARKS, S.L.; PESAVENTO, P.A.; DELLA MAGGIORE, A.; ZHU, B.Y.; GROOTERS, A.M. Successful management of 3 dogs with colonic pythiosis using itraconazole, terbinafine, and prednisone. **Journal of Veterinary Medicine**. v.33, n.3, p. 1434-1439, 2019.

RECH, R.R.; GRAÇA, D.L.; BARROS, C.L.S. Pitiose em um cão: Relato de caso e diagnósticos diferenciais. **Clínica Veterinária**, v.50, p. 68-72, 2004.

RIBEIRO, T.C.; WEIBLEN, C.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B.; DE JESUS, F.P.K.; VERDI, C.M.; GRESSLER, L.T.; SANGIONI, L.A.; SANTURIO, J.M. *In vitro* susceptibility of the oomycete *Pythium insidiosum* to metallic compounds containing cadmium, lead, copper, manganese or zinc. **Medical Mycology**, v.55, p.669-672, 2017.

RIET-CORREA, F. et al. Pitiose em canino. **Boletim do Laboratório Regional de Diagnóstico-UFPEL**. Pelotas: Editora e Gráfica Universitária, 1998, 55 p.

RODRIGUES, A. GRAÇA, D.L.; FONTOURA, C.; CAVALHEIRO, A.S.; HENZEL, A.; SCHWENDLER, S.E.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. Intestinal dog pythiosis in Brazil. **Journal de Mycologie Médicale**. v. 16, p. 37-41, 2006.

ROMERO, A.; GARCÍA, J.; BALESTIÉ, S.; Malfatto, F.; VICENTINO, A.; SALLIS, E.S.V.; SCHILD, A.L.; DUTRA, F.Q. Equine pythiosis in the eastern wetlands of Uruguay. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.39, n.7, p.469-475, 2019.

SALLIS, E.S.V.; PEREIRA, D.I.B.; RAFFI, M.B. Pitiose cutânea em eqüinos: 14 casos. **Ciência Rural**, v.33, n.5, p.899-903, 2003.

SÁNCHEZ, C.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. The effect of carvacrol on enteric viruses. **International Journal of Food Microbiology**, v.192, p.72–76, 2015.

SCHANZEMBACH, M.; BRAYER, D.; SALLIS, S.; CÉSAR, D.; MATTO, C.; ALMEIDA, R.; NAN, F.; RODRÍGUEZ, V.; PARODI, P.; PEREIRA, M.; GIANNEECHINI, R.; RIVERO, R. Description of a case of equine cutaneous pythiosis and its diagnosis by means of different techniques. **Veterinaria** 2019, v.55, n.212, p.96-101, 2019.

SCHURKO, A.; MENDOZA, L.; DE COCK, A.W.; KLASSEN, G.R. Evidence for geographic clusters: Molecular genetic differences among strains of *Pythium insidiosum* from Asia, Australia, and the Americas are explored. **Mycologia**, v.95, n.2, p.200-208, 2003.

SEPULCHRO, L.C.; Carvalho, M.A.G.; Gomes, L.C. Salinity does not alter the effectiveness of menthol as an anesthetic and sedative during the handling and transport of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus*). **Brazilian Journal of Biology**, v.76, n.3, p.757-63, 2016.

SILVA, C.S.; FIGUEIREDO, H.M.; STAMFORD, T.L.M.; SILVA, L.H.M.D. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil in ground beef. **International Journal of Food and Microbiology**, v.16, n.293, p.79-86, 2019.

SOUTO, E.P.F.; MAIA, L.A.; OLINDA, R.G.; GALIZA, G.J.N.; KOMMERS, G.D.; MIRANDA-NETO, E.G.; DANTAS, A.F.M.; RIET-CORREA, F. Pythiosis in the Nasal Cavity of Horses. **Jornal of Comparative Pathology**, v.155, n.2-3, p.126-129, 2016.

SOUZA, D.P. Evolution of the Anticonvulsant Activity of α -Terpineol. **Pharmaceutical Biology**, v.45, n.1, p.1744-5116, 2007.

THIEMAN, K.M. Diagnosis and treatment of truncal cutaneous pythiosis in a dog. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.239, n.9, p. 1232-1235, 2011.

TONPITAK, W.; PATHOMSAKULWONG, W.; SORNKLIEN, C.; KRAJAEJUN, T.; WUTTHIWITHAYAPHONG, S. First confirmed case of nasal pythiosis in a horse in Thailand. **JMM case reports**, v.5, n.1, p. e005136, 2018.

TRAGOOLPUA, Y.; Jatisatienr, A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy research**, v.21, n.12, p.1153-1158, 2007.

TROLEZI, R.; AZANHA, J.M.; PASCHOAL, N.R.; CHECHI, J.L.; DIAS SILVA, M.J.; FABRIS, V.E.; VILEGAS, W.; KANENO, R.; FERNANDES JUNIOR, A.; BOSCO, S.M. *Stryphnodendron adstringens* and purified tannin on *Pythium insidiosum*: *in vitro* and *in vivo* studies. **Annals of Clinical Microbiology Antimicrobial**, v.1, p.1-7, 2017.

TURCHENIUUK, V.; TURCHENIUUK, V.; RAKS, V.; ISSA, R.; COOPER, I.R.; CRAGG, P.J.; JIJIE, R.; DUMITRASCU, N.; MIKHALOVSKA, L.I.; BARRAS, A.; ZAITSEV, V.; BOUKHERROUB, R.; SZUNERITS, S. Antimicrobial activity of menthol modified nanodiamond particles. **Diamond and Related Materials**, v.57, n.1, p.2-8, 2015.

VALENTE J.S.S.; FONSECA, A.O.; BRASIL, C.L.; SAGAVE, L.; FLORES, F.C.; SILVA, C.B.; SANGIONI, L.A.; PÖTTER, L.; SANTURIO, J.M.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. In Vitro Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum*. **Mycopathologia**, v.181, n. (11-12), p.865-869, 2016a.

VALENTE J.S.S.; FONSECA, A.O.; DENARDI, L.B.; DAL BEM, V.S.; MAIA FILHO, F.S.; BAPTISTA, C.T.; BRAGA, C.Q.; ZAMBRANO, C.G.; ALVES, S.H.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. *In vitro* susceptibility of *Pythium insidiosum* to *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Origanum vulgare* essential oils combinations. **Mycopathologia**, v.181, n.5-6, 2016b.

VALENTE, J.S.S.; FONSECA, A.O.; DENARDI, L.B.; DAL BEM, V.S.; MAIA FILHO, F.S.; ZAMBRANO, C.G.; BRAGA, C.Q.; ALVES, S.H.; BOTTON, S.A.; BRAYER PEREIRA, D.I. *In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum*. **Journal of Applied Microbiology**, v.121, n.4, p.998-1003, 2016c.

VALENTE J.S.S, BRAGA, C.Q.; BRASIL, C.L.; BAPTISTA, C.T.; REIS, G.F.; PANAGIO, L.A.; NAKAZATO, G.; HÜBNER, S.O.; SOARES, M.P.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. *In vitro* anti-*Pythium insidiosum* activity of biogenic silver nanoparticles. **Medical Mycology**, v.57, n.7, p.858–863, 2018.

WEIBLEN, C.; MACHADO, G.; JESUS, F.P.K.; SANTURIO, J.M.; ZANETTE, R.A.; PEREIRA, D.I.B.; DIEHL, G.N.; SANTOS, L.C.; CORBELLINI, L.G.; SÔNIA DE AVILA BOTTON, S.A. Seroprevalence of *Pythium insidiosum* infection in equine in Rio Grande do Sul, Brazil. **Ciência Rural**, v.46, n.1, p.126-131, 2016.

YADAV, G.D.; KAMBLE, S.B. Synthesis of carvacrol by Friedel-Crafts alkylation of o-cresol with isopropanol using superacidic catalyst UDCaT-5. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v.84, n.10, p.1499–1508, 2009.

1 ZAMBRANO, C.; GOMES, A.R.; BRASIL, C.L.; VALENTE, J.S.S.; BRAGA, C.Q.; DE
2 AZEVEDO, M.I.; BOTTON, S.A.; PEREIRA, D.I.B. Influence of Temperature on *in*
3 *vitro* Zoosporogenesis of *Pythium insidiosum*. **Medical Mycology**. v.56, n.7, p. 877-
4 883, 2018.

5
6 ZANETTE, R.A.; BITENCOURT, P.E.R.; ALVES, S.H.; FIGHERA, R.A.; FLORES,
7 M.M.; WOLKMER, P.; HECKTHEUER, P.A.; THOMAS, L.R.; PEREIRA, P.L.;
8 LORETO, É.S.; SANTURIO, J.M. Insights into the pathophysiology of iron
9 metabolism in *Pythium insidiosum* infections. **Veterinary Microbiology** v. 162, p.
10 826–830, 2013.

11
12 ZANETTE, R.A.; JESUS, F.P.; PILOTTO, M.B.; WEIBLEN, C.; PÖTTER, L.;
13 FERREIRO, L.; ALVES, S.H.; SANTURIO, J.M. Micafungin alone and in combination
14 therapy with deferasirox against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie**
15 **Médicale**, v.25, n.1, p. 91-94, 2015.

Anexos

Anexo A: Documento de aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal-UFPeI: Ratos Wistar.



Pelotas, 14 de dezembro de 2015

De: M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEa)

Para: Profa. Daniela Isabel Brayer Pereira

Departamento de Microbiologia e Parasitologia – Instituto de Biologia

Senhora Professora:

A CEEA analisou as correções feitas no projeto intitulado: **“Ação cicatrizante de uma pomada a base de Silagem de Colostro Bovino”** processo nº23110.003680/2013-02, que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, Subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, sendo de parecer **FAVORÁVEL** a sua execução, pois está de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA).

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao COBALTO para posterior registro no COCEPE (código para cadastro nº CEEA 3680-2013).

Vigência do Projeto: 16/12/2015 a 16/12/2016

Espécie/Linhagem: *Rattus norvegicus*/Wistar

Nº de animais: 30

Idade: 5-6 semanas

Sexo: Fêmeas ou machos

Origem: Biotério Central - UFPeI

M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix

Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2015

Assinatura do Professor Responsável: _____

Anexo B: Documento de aprovação do Comitê de ética em Experimentação Animal-UFPeI: Coelhos Nova Zelândia.



Pelotas, 27 de abril de 2016

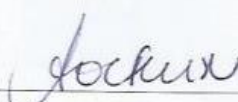
Certificado

Certificamos que a proposta intitulada "**Aplicação de óleos essenciais de plantas medicinais em combinações como estratégia terapêutica para controle da pitiose experimental**", registrada com o nº23110.002723/2016-77, sob a responsabilidade de **Daniela Isabel Brayer Pereira** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e recebeu parecer **FAVORÁVEL** a sua execução pela Comissão de Ética em Experimentação Animal, em reunião de 11/04/2016.

Finalidade	(X) Pesquisa () Ensino
Vigência da autorização	05/09/2016 a 05/06/2017
Espécie/linhagem/raça	Coelho/Nova Zelândia
Nº de animais	42
Idade	2 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Fornecedor Roberto Pegoraro, Feliz/RS

Solicitamos, após tomar ciência do parecer, reenviar o processo à CEEA.

Salientamos também a necessidade deste projeto ser cadastrado junto ao *COBALTO* para posterior registro no *COCEPE* (código para cadastro nº CEEA 2723-2016).



M.V. Dra. Anelize de Oliveira Campello Felix
Presidente da CEEA

Ciente em: ____/____/2016

Assinatura do Professor Responsável: _____

Anexo C: Tabelas suplementares do artigo 2.**Supplementary Table****Table S1:** Data demonstrating lesion area (A) and lesion progression (%) of group 1 rabbits (Control) inoculated with *P. insidiosum* zoospores.

Measurement	Unit	Day										%*
Rabbit		1st	5th	10th	15th	20th	25th	30th	35th	40th	45th	
#1	W	5.55	5.67	5.69	5.69	5.74	6.24	5.80	6.50	7.10	7.71	77.03
	H	5.90	5.89	6.20	6.20	6.40	5.92	7.18	7.89	8.40	7.51	
	A	32.70	33.48	35.28	35.80	36.73	36.95	41.64	51.28	59.68	57.89	
#2	W	5.40	6.70	3.18	6.80	7.38	8.60	8.55	8.75	9.20	9.18	187.39
	H	5.10	6.71	3.15	7.80	8.57	8.17	8.55	8.77	9.75	9.14	
	A	29.20	41.4	45.04	53.60	63.25	70.26	73.11	76.73	89.75	83.92	
#3	W	5.24	5.50	1.55	5.96	5.95	6.02	7.41	7.76	9.00	9.00	154.89
	H	5.24	5.51	1.68	5.96	6.25	6.50	7.45	7.76	7.80	7.80	
	A	27.47	30.27	33.66	35.50	37.18	39.10	55.21	60.21	70.02	70.02	
Average		29.79	35.05	38.10	41.66	45.72	48.77	56.64	62.74	73.15	70.61	137.00

W= width (mm); H=height (mm); A= lesion area (mm²). %* = (lesion area2*x100/lesion area1*)-100; *i.e.: lesion area 2 corresponds to the current measurement and lesion area 1 corresponds to the previous measurement.

Table S2: Data demonstrating lesion area (A) and lesion progression (%) of group 2 rabbits inoculated with *P. insidiosum* zoospores and treated with a gel-based formulation of bio-AgNP.

Measurement		Day										%*
		1st	5th	10th	15th	20th	25th	30th	35th	40th	45th	
Rabbit	Unit											
#1	W	5.41	5.40	5.41	5.73	6.09	6.15	6.68	6.62	5.10	1.99	- 86.31
	H	5.39	5.40	5.42	5.73	6.11	6.99	6.60	6.90	5.67	2.01	
	A	29.15	29.15	29.3	32.82	37.20	43.00	47.7	45.7	30.94	3.99	
#2	W	5.48	5.59	4.70	4.28	4.13	3.89	3.12	2.50	2.23	1.40	-93.46
	H	5.49	5.55	4.90	4.27	4.15	3.93	2.64	1.60	1.80	1.40	
	A	30.01	31.0	23.0	18.26	17.12	15.27	8.23	1.96	1.96	1.96	
#3	W	7.72	4.02	4.08	5.23	5.33	4.98	6.03	5.65	5.00	1.97	-88.63
	H	4.50	5.70	5.69	5.24	5.10	4.98	4.50	4.51	4.54	2.01	
	A	34.74	22.92	23.2	27.40	27.22	24.8	27.14	25.48	22.70	3.95	
Average		31.24	27.69	25.15	26.16	27.18	27.69	27.69	24.38	18.54	3.30	-89.43

W= width (mm); H=height (mm); A= lesion area (mm²). %* = (lesion area2*x100/lesion area1*)-100; *i.e.: lesion area 2 corresponds to the current measurement and lesion area 1 corresponds to the previous measurement.

Table S3: Data demonstrating lesion area (A) and lesion progression (%) of group 3 rabbits inoculated with *P. insidiosum* zoospores and treated with bio-AgNP intralesion.

Measurement		Day										%*
		1st	5th	10th	15th	20th	25th	30th	35th	40th	45th	
Rabbit	Unit											
#1	W	6.98	5.89	5.50	4.41	3.10	3.80	3.34	4.01	3.04	4.45	-59.23
	H	6.99	7.46	5.42	5.02	4.90	4.53	5.00	3.22	3.90	4.47	
	A	48.78	43.97	29.8	22.12	15.19	17.22	16.67	12.09	11.86	19.89	
#2	W	10.21	5.80	5.10	5.65	5.01	6.00	5.64	6.46	8.03	6.99	-28.13
	H	8.71	5.78	5.90	5.67	5.25	5.21	5.56	6.47	5.99	9.14	
	A	88.9	33.53	30.01	32.00	26.29	31.27	31.90	41.81	48.09	63.89	
#3	W	5.80	6.15	6.20	4.60	3.80	4.10	3.01	3.10	4.03	3.90	-58.59
	H	6.35	5.99	5.97	4.30	3.93	3.97	5.39	5.23	2.33	3.91	
	A	36.83	36.83	37.00	19.8	14.90	16.28	16.20	16.21	9.38	15.25	
Average		58.17	38.1	32.26	24.64	18.8	21.59	21.84	23.37	23.11	33.01	-43.25

W= width (mm); H=height (mm); A= lesion area (mm²). %* = (lesion area2*x100/lesion area1*)-100; *i.e.: lesion area 2 corresponds to the current measurement and lesion area 1 corresponds to the previous measurement.