UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Instituto de Biologia

Trabalho de conclusão de curso

Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente aos óleos de *Helianthus annus* L., *Eugenia caryophyllata* e suas combinações

Caroline Quintana Braga

Pelotas, 2017

CAROLINE QUINTANA BRAGA

Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente aos óleos de *Helianthus annus* L., *Eugenia caryophyllata* e suas combinações

Monografia de trabalho de conclusão de curso apresentado ao Instituto de Biologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Licenciatura em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Drª Daniela Isabel Brayer Pereira

Co-orientadora: MSc Júlia de Souza Silveira Valente

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B813s Braga, Caroline Quintana

Suscetibilidade in vitro de Pythium insidiosum frente aos óleos de Helianthus annus l., Eugenia caryophyllata e suas combinações / Caroline Quintana Braga ; Daniela Isabel Brayer Pereira, orientadora ; Júlia de Souza Silveira Valente, coorientadora. — Pelotas, 2017.

37 f.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) — Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Oomicetos. 2. Pitiose. 3. Helianthus annus l.. 4. Eugenia caryophyllata. I. Pereira, Daniela Isabel Brayer, orient. II. Valente, Júlia de Souza Silveira, coorient. III. Título.

CDD : 661.806

Elaborada por Ubirajara Buddin Cruz CRB: 10/901

Caroline Quintana Braga

Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente aos óleos de *Helianthus annus* L.*, Eugenia caryophyllata* e suas combinações

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado, como requisito parcial, para obtenção do grau de Bacharel ou Licenciatura Ciências Biológicas do Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 21 de dezembro de 2017

Banca examinadora:

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

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

Ms Carolina Litchina Brasil. Mestre em Medicina Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Ms Cristiane Telles Baptista. Mestre em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

A minha querida avó Neiva, por todo o apoio, carinho e amor, seus ensinamentos jamais serão esquecidos e a senhora dedico esta, bem como todas as minhas demais conquistas.

Aos meus amados pais Carlos Alberto e Ivonete, pela educação, por orientar meus passos e pelo apoio incondicional.

Ao meu irmão Mateus por todas as alegrias e a minha estimada avó Aida por todo afeto.

Ao meu estimado namorado Juliano que de forma especial e carinhosa me deu força e coragem, me apoiando nos momentos de dificuldades.

A minha querida orientadora professora Drª. Daniela Pereira, pela orientação, apoio e aprendizado durante todo este período.

A minha co orientadora Ms. Júlia Valente por toda a ajuda nesta caminhada.

A minha colega e amiga Cristiane pela amizade.

Aos professores do curso que dedicaram seu tempo e sua experiência para que minha formação fosse também um aprendizado de vida, me fazendo acreditar que somos capazes de criar e ousar.

E a todos as pessoas que de alguma forma contribuíram para minha formação acadêmica, muito obrigada!

Resumo

BRAGA, Caroline Quintana. **Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* frente aos óleos de *Helianthus annus L., Eugenia caryophyllata* e suas combinações** 2017. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Pythium insidiosum é um oomiceto aquático causador da pitiose, uma enfermidade infecciosa, não contagiosa, e de prognóstico desfavorável. Fármacos antifúngicos convencionais são pouco eficazes sobre esse micro-organismo, pois a maioria possui seu mecanismo de ação atuando sobre o ergosterol da membrana celular, que está ausente neste oomiceto. Apesar do avanço nas pesquisas, o tratamento da pitiose ainda não está completamente estabelecido. Diante desses fatos, a terapia utilizando óleos essenciais de plantas bioativas e suas associações surgem como novas alternativas no combate a esse patógeno. O presente estudo buscou avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente ao óleo de *Helianthus annus L*. ozonizado e a *Eugenia caryophyllata* individualmente e combinados entre si, frente a 30 e 20 isolados clínicos de *P. insidiosum*, respectivamente. O inóculo utilizado no teste de suscetibilidade foi preparado a partir de cultura micelial de *P. insidiosum*. Para a realização do teste de suscetibilidade empregou-se o método de microdiluição em caldo baseado no protocolo M-38A2 do CLSI e as combinações foram avaliadas pela técnica de *cherkerboard*. O óleo de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* foram obtidos comercialmente e os componentes do óleo essencial foram previamente determinados pelo fabricante. As concentrações testadas variaram entre 56.000µg/mL a 0,05 µg/mL para ambos os óleos. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM). A menor concentração do óleo que não evidenciou crescimento foi considerada a CFM. Os resultados para os testes isoladamente demonstram que a CIM_{50} e CIM_{90} foram de 3500 µg/mL e 28000 µg/mL, respectivamente para *H. annus* L. e de 875 µg/mL e 7000 µg/mL, respectivamente para *E. caryophyllata.* A combinação de ambos os óleos evidenciou sinergismo em 95% (19/20) dos isolados avaliados e indiferença em 5% (1/20). Os resultados obtidos no presente estudo sugerem que os óleos de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* podem constituir-se numa terapia adicional ao tratamento da pitiose. No entanto, outras pesquisas são necessárias para verificar sua aplicabilidade em pitiose clínica.

Palavras – chave: Oomicetos, pitiose, *Helianthus annus* L., *Eugenia caryophyllata*

Abstract

BRAGA, Caroline Quintana. ***In vitro* Susceptibility of *Pythium insidiosum* In front of OIL *Helianthus annus L., Eugenia caryophyllata* their combinations** 2017. 37f. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) – Curso de Ciências Biológicas Licenciatura, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

Pythium insidiosum is an aquatic oomycete that causes pythiosis, an infectious disease, non-contagious and prognostic unfavorable. Conventional antifungal drugs are inefficient on this microorganism, since most have their mechanism of action acting on the ergosterol of the cell membrane, which is absent in this oomycete. Despite advances in research, pythiosis treatment has not yet been fully established. Diantedos facts, the therapy using alternative solutions to combat this pathogen. The present study aimed to evaluate an in vitro susceptibility of *P. insidiosum* to *Helianthus annus* L. ozonized oil and *Eugenia caryophyllata* individually and in combination with 30 and 20 clinical isolates of *P. insidiosum*, respectively. The inoculum used without the recipe test was prepared from mycelial *P. insidiosum*. For a performance recipe test, use the broth microdilution method based on the M-38A2 protocol make CLSI and as combinations with evaluators of the search technique. The oil of *H. annus* L. and *E. caryophyllata* were obtained commercially and the essential oil components. As concentrations tested ranged from 56,000 µg / mL to 0.05 µg / mL for both oils. A reading carried out on growth issues or not, with the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) being identified. As concentrations above the minimum inhibitory concentration for the determination of Minimum Fungicidal Concentration (CFM). The lowest concentration of oil that is not likely from a CFM. The results for the tests alone demonstrate that MIC and CIM90 were 3500 µg / mL and 28000 µg / mL, respectively for *H. annus* L. and 875 µg / mL and 7000 µg / mL, respectively, for *E. caryophyllata*. A combination of both glasses showed synergism in 95% (19/20) of the isolates and indifference in 5% (1/20). The results obtained in the present study suggest that the oils of *H. annus* L. and *E. caryophyllata* may constitute an additional therapy to the treatment of pythiosis. However, further research is needed to verify its practice in clinical pythiosis.

Keywords: Oomycete; pythiosis; *Helianthus annus* L., *Eugenia caryophyllata*

Lista de Tabelas

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* (n=30) aos óleos de *Helianthus annus* L. e *Eugenia caryophyllata* 22

Tabela 2: Perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos de *Helianthus annus* L. (HA) *Eugenia caryophyllata* (EC) 23

Sumário

Introdução 10
Objetivo Geral 12
Objetivo Específico 12
Revisão de Literatura..... 13
Materiais e Métodos 19
Resultados 22
Discussão 24
Conclusão 27
Referências 28

Introdução

Pythium insidiosum é o agente causador da pitiose em mamíferos (GAASTRA et al., 2010). Trata-se de um oomiceto aquático classificado no Reino Stramenopila, Classe Oomycetes, Ordem Pythiales, Família Pythiaceae, Gênero *Pythium* e Espécie *Pythium insidiosum* (ALEXOUPOLOS, 1996).

A pitiose, causada por *P. insidiosum*, possui distribuição mundial, ocorrendo em regiões de clima tropical e subtropical (MENDOZA et al., 1996).

A ausência de ergosterol na membrana citoplasmática, componente alvo da maioria dos antifúngicos, e a diferença na composição de parede, a qual não possui quitina em sua composição, são algumas das peculiaridades desse micro-organismo que dificultam o tratamento da pitiose em animais e humanos. Dessa forma, as drogas antifúngicas são ineficientes e a maioria dos animais atingidos não sobrevive em decorrência da doença (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003).

Diversas terapias têm sido utilizadas frente à pitiose, incluindo cirurgia, imunoterapia e tratamento com antifúngicos. Todavia, muitos casos apresentam insucessos e os resultados variam consideravelmente (GAASTRA et al. 2010). O tratamento é difícil e desafiador para qualquer espécie afetada. A cirurgia é defendida por vários autores como o método mais eficaz no tratamento, porém ela não pode ser realizada em todos os casos, pois depende do local da lesão e o comprometimento que irá causar aos tecidos (CHAFFIN et al., 1995, GAASTRA et al., 2010; PEREIRA et al., 2013).

Diante dos fatos, muitos estudos têm avaliado tentativas de tratamento de indivíduos doentes e testes de suscetibilidade *in vitro,* os quais foram realizados utilizando fármacos antifúngicos assim como: anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol, compostos iodínicos, terbinafina e caspofungina, com resultados variáveis e alguns pouco promissores (MCMULLAN et al.,1977; GONZALES et al., 1979; DYKSTRA et al., 1999; GROOTERS, 2003; PEREIRA et

al., 2007; ARGENTA et al., 2008, 2012; CAVALHEIRO et al., 2009a,b; JESUS et al., 2014; ZANETTE et al., 2015).

Dentre estas investigações ressalta-se a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas que podem constituir numa vantagem terapêutica no controle de infecções causadas por *P. insidiosum* (FONSECA et al. ,2015a), bem como de compostos extraídos de plantas, incluindo as raízes e frutos (SRIPHANA et al., 2013[a],[b]); SUTHIWONG et al., 2014).

Pesquisas empregando óleos essenciais de plantas como alternativas de tratamento em diferentes enfermidades têm aumentado nos últimos anos. Estes compostos apresentam como vantagens a baixa toxicidade às células dos mamíferos, menor impacto ambiental e boa aceitação pelos consumidores FONSECA et al. (2015b).

Considerando-se as dificuldades encontradas na cura da pitiose, a necessidade de alternativas terapêuticas e o potencial antimicrobiano dos óleos extraídos de plantas, elaborou-se o presente estudo que busca avaliar a suscetibilidade in vitro de P. insidiosum frente a óleo de *Helianthus annus* L. ozonizado (óleo de girassol) e à *Eugenia caripholiatta* (óleo de cravo), individualmente e combinados entre si.

Objetivos

Objetivo geral

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* ao óleo de *Helianthus annus* L. ozonizado e ao óleo essencial de *Eugenia cariophollata* isoladamente e em combinação.

Objetivos específicos

- Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* ao óleo de *Helianthus annus* L. ozonizado (óleo de girassol);
- Verificar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* ao óleo essencial de *Eugenia cariophollata* (óleo de cravo);
- Testar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente ao óleo de *Helianthus annus* L. ozonizado combinado à *Eugenia cariophollata.*

Revisão de Literatura

Pythium insidiosum e pitiose

Os oomicetos do gênero *Pythium* compreendem micro-organismos termofílicos, ubíquos, presentes em ecossistemas de água doce e no solo. Esse gênero inclui mais de 140 espécies descritas, sendo algumas dessas sapróbias e outras patógenas para plantas (ALEXOPOULOS, 1996; KAGEVAMA, 2014).

A pitiose é uma enfermidade infecciosa de rápida evolução e difícil tratamento. Possui distribuição mundial, ocorrendo em regiões de clima tropical, subtropical e temperado (MENDOZA et al., 1996). Porém, ocorre com maior frequência em áreas pantanosas e alagadiças, sendo endêmica na Tailândia e no Brasil, destacando-se o Mato Grosso do Sul (Pantanal) e o Rio Grande do Sul como os estados brasileiros com a maior ocorrência da doença. Os mamíferos afetados adquirem a enfermidade ao entrar nestes ambientes aquáticos, permanecendo nestes locais por longo período (CHAFFIN et al., 1995).

Em seu ciclo biológico, *P. insidiosum* utiliza plantas aquáticas para o seu desenvolvimento, fazendo reprodução assexuada que se caracteriza pela formação de zoósporos infectantes os quais são liberados na água e movimentam-se até encontrar outra planta para completar seu ciclo. Todavia, estes zoósporos também podem ser atraídos por quimiotaxia para tecidos danificados, onde se fixam e emitem tubos germinativos dando início a infecção (MILLER, 1983). Não há predisposição por raça, idade ou sexo, nem há relatos da contaminação entre os animais e o homem. (MENDONZA; AJELLO; MCGINNIS, 1996; SANTURIO et al., 2006).

A pitiose é uma doença que afeta diversos animais sendo os equinos e caninos as mais afetadas (GAASTRA et al., 2010). A espécie equina é a mais afetada e os animais se infectam ao entrar em contato com áreas alagadas e com presença de zoósporos. Nestes animais, a enfermidade caracteriza-se pelo

desenvolvimento de lesões ulcerativas granulomatosas, de evolução rápida, formando grandes massas teciduais de bordas irregulares e aparência tumoral. No interior das lesões observa-se abundante tecido conjuntivo fibroso de consistência firme e aspecto arenoso e ramificadas (kunkers) que facilmente se desprendem do local da lesão (CHAFFIN et al.,1995; MENDOZA et al., 1996). Os “kunkers” auxiliam no diagnóstico da doença, porém ao se desprenderem da lesão em ambientes favoráveis, refazem o ciclo biológico mantendo a contaminação do ambiente (FONSECA et al., 2014). Já nas demais espécies, os ‘’kunkers’’ não são observados e a doença se manifesta na forma de piogranulomas gastrintestinais e cutâneos (MILLER et al., 1983; FOIL et al., 1984; GROOTERS, 2003). Em caninos, as lesões gastrointestinais são as mais comuns (GROOTERS, 2003), enquanto as formas cutâneas/subcutâneas com desenvolvimento de lesões ulcerativas são frequentes nas demais espécies, incluindo bovinos (PÉREZ et. al., 2005; GRECCO et al., 2009), ovinos (TABOSA et al., 2004), caprinos (DO CARMO et al., 2015) e felinos (BISSONNETTE et al., 1991; RAKICH et al., 2005).

Em humanos a pitiose é uma enfermidade de prognóstico desfavorável, sendo comum na Tailândia (KRAJAEJUM et al., 2006), manifestando-se nas formas cutânea, ocular e sistêmica (TRISCOTT et al., 1993; IMWIDTHAYA, 1994, 1995; SHENEP et al., 1998; SUDJARITRUCK; SIRISANTHANA, 2011; KEOPRASOM et al., 2012).

Tratamento

O tratamento de infecções causadas por *P. insidiosum* é complicado e desafiador, explicado pelas características do oomiceto, pois este, não possui em sua parede celular quitina e a membrana plasmática não contém ergosterol, um componente alvo da maioria dos antifúngicos (FOIL, 1996).

O sucesso das diferentes formas de tratamento é variável, sendo a cirurgia o método mais frequente. Porém, a localização das lesões em estruturas anatômicas como os membros, muitas vezes dificulta a retirada de toda área afetada, o que predispõe a altas taxas de recidiva (45%) (GAASTRA et al., 2010).

Os resultados com tratamentos empregando antifúngicos são bastante variados, uma vez que os principais antifúngicos agem direta ou indiretamente sobre o ergosterol, que está ausente na membrana plasmática de *P. insidiosum.* Dessa

forma, essas drogas antifúngicas são ineficientes e a maioria dos animais atingidos não sobrevive em decorrência da infecção (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). No entanto, diversos autores realizaram testes de suscetibilidade *in vitro* empregando fármacos antifúngicos, assim como: anfotericina B, cetoconazol, miconazol, fluconazol, itraconazol, compostos iodínicos, terbinafina e caspofungina com resultados pouco promissores (MCMULLAN et al.,1977; GONZALES et al., 1979; DYKSTRA et al., 1999; GROOTERS, 2003; PEREIRA et al., 2007; ARGENTA et al., 2008; CAVALHEIRO et al., 2009a,b). Estudos avaliando a associação de fármacos antifúngicos *in vivo* demonstraram sinergismo na combinação micafungina com deferasirox em animais experimentais (ZANETTE et al., 2015).

A imunoterapia desenvolvida a partir de culturas do próprio agente utilizando um macerado de hifas (Miller,1981) é a alternativa terapêutica mais eficaz de tratamento da pitiose equina. Todavia, independente do grande progresso nas pesquisas empregando outras formulações de imunoterápicos (MENDOZA; ALFARO, 1986; MENDOZA et al. 1992; MONTEIRO, 1999, SANTURIO et al., 2003), há o relato de equinos não responsivos a imunoterapia e o emprego deste protocolo em cães e gatos tem sido desapontador (MENDOZA; NEWTON, 2005).

Óleos essenciais

As plantas são utilizadas há milhares de anos na terapêutica. Suas partes como raiz, folhas e flores fornecem substâncias bioativas capazes de auxiliar na cura de doenças e na fabricação de medicamentos (ROSA et al., 2012). Essas substâncias se destacam pelas suas propriedades medicinais, que incluem ações antimicrobianas, analgésicas, anestésicas, anti-inflamatórias e anti-espasmolíticas (BAKKALI; AVERBECK; AVERBECK, 2008).

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

causando sua despolarização e consequentemente gerando estresse oxidativo, o qual leva a célula à morte por apoptose (BAKKALI et al., 2008). Suas propriedades terapêuticas despertaram um crescente interesse nos estudos relacionados à terapia antimicrobiana. Além disso, por se tratar de compostos naturais, os mesmos apresentam um alto potencial medicinal na busca por tratamentos com baixa toxicidade e menos agressivos FONSECA et al. (2015b).

Estudos empregando compostos aromáticos e bioativos de plantas surgiram recentemente como uma nova linha de pesquisa na terapêutica da pitiose. Nesse sentido, investigações sobre a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum*, frente a óleos essenciais de *Origanum vulgare, Origanum majorana, Mentha piperita, Rosmarinus officinalis* e *Melaleuca alternifolia* demonstraram resultados promissores (FONSECA, 2011; FONSECA et al., 2015ª,b VALENTE et al., 2016abc). Da mesma forma, pesquisas vêm avaliando a ação antimicrobiana de compostos bioativos e óleos essenciais de plantas (JESUS et al., 2014ª, 2015b; FONSECA et al., 2015a,b), bem como de compostos extraídos de raiz (SRIPHANA et al., 2013ab) e de frutos de plantas (SUTHIWONG et al. 2014).

O óleo essencial de cravo (*Eugenia cariophollata)* é uma especiaria usada há muitos anos na culinária, perfumaria e também apresenta propriedade antibactericida. Quando testada contra bactérias com *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Campylobacter jejuni, Salmonella enteritidis* e *Listeria monocytogenes,* a ação do óleo diminuiu significativamente a taxa de crescimento destes micro-organismos (SCHERER et al., 2009).

Segundo Hisano et al. (2008), o óleo de cravo também é empregado como anestésico em peixes. Esse óleo tem como princípio ativo o eugenol, um composto fenólico (4-alil-2-metoxifenol-$C_{10}H_{12}O_2$), que está presente no caule, flores e folhas da planta (GRIFFITHS, 2000). O eugenol possui atividade antibactericida contra *Streptococus mutans, Bacillus cereus* e antifúngica conta *Aspergillus niger, Candida albicans,* entre outras espécies de fungos, além de possuir efeito anti-inflamatório, cicatrizante e analgésico (DELESPAUL et al., 2000).

O óleo de girassol (*Helianthus annus* L.) por sua vez, tem aplicações em diversas finalidades como na indústria cosmética, farmacêutica, alimentícia, veterinária, dentre outras. Este óleo tem como principais componentes majoritários os ácidos linoleicos e oleicos. A aceleração do processo inflamatório gerado pelo uso do óleo de semente de girassol foi observada no estudo de Marques et al.

(2004), o qual utilizou esse composto no tratamento de feridas cutâneas em 18 carneiros da raça Santa Inês. Segundo esses autores houve uma rápida formação do tecido de granulação e epitelização nas feridas.

Os óleos podem ser utilizados na sua forma pura ou adicionados de ozônio. A utilização do ozônio no tratamento de diversas enfermidades é conhecida como ozonoterapia. O ozônio apresenta benefícios quando utilizado como agente terapêutico devido ao fato de ser um potente oxidante, participando ativamente do processo de cicatrização devido às suas propriedades antimicrobianas. Quando associado com óleos apresenta diversas características biológicas importantes como a ação bactericida, inativação de fungos e vírus, proliferação celular e tecidual (BOCCI et al., 1994). Weiller et al. (2013) demonstraram a eficiência do óleo de girassol ozonizado em pacientes com diabetes, auxiliando no processo de redução da área das feridas dos pacientes.

Segundo Schwartz et al. (2011) os óleos ozonizados possuem algumas atividades biológicas no local da lesão como a intensa atividade germicida, a ativação da micro circulação local, melhora o metabolismo celular de oxigênio e promove o estímulo de crescimento do tecido de granulação, revitalizando o tecido epitelial.

De acordo com Silva et al. (2008) a ação do ozônio sobre os micro-organismos se dá sobre a parede celular, decorrente da oxidação de glicopeptídeos, glicoproteínas e aminoácidos, alterando assim a permeabilidade e causando a lise celular. Uma vez no interior da célula, o ozônio recombina-se com elementos citoplasmáticos promovendo a oxidação de aminoácidos e ácidos nucleicos, ocasionando a clivagem dos mesmos e consequentemente a morte celular (VELANO et al., 2001).

Na medicina veterinária o óleo de girassol tem sido muito utilizado, na sua forma pura ou ozonizado, para o tratamento de lesões como demonstrado por Sanchez (2008), o qual utilizou a aplicação tópica do óleo ozonizado no tratamento de lesões em *Cavia porcellus,* mostrando-se eficaz devido suas características antisséptica e estimulante da cicatrização. Relatos utilizando a terapia tópica de ozônio também já foram demonstrados em ratos com a aplicação de água ozonizada para a avaliação da cicatrização, sendo comprovada diferença na concentração da ferida e, portanto na reparação tecidual (TRAINA et al., 2008). Apesar de

apresentarem todos esses benefícios terapêuticos, ainda não são conhecidos registros da aplicabilidade desses compostos no combate a *P. insidiosum*.

MATERIAL E MÉTODOS

Amostras de *P. insidiosum*

Foram utilizados 30 isolados de *P. insidiosum*, oriundos de 28 equinos e 2 caninos naturalmente infectados, provenientes do Estado do Rio Grande do Sul. Todos os isolados avaliados pertenciam a micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Pelotas, e foram mantidas em tubos contendo agar levedura (AL), a temperatura ambiente.

Preparo dos inóculos

Os testes de suscetibilidade *in vitro* foram realizados utilizando como inóculo o micélio de *P. insidiosum*, preparado conforme previamente descrito por Fonseca et al. (2014). O inóculo foi preparado a partir do cultivo de duas placas de Petri contendo agar levedura, incubadas durante quatro dias em estufa a 37ºC. Sobre estas culturas foi dispensado um volume de 10mL de água destilada estéril e o micélio foi raspado com auxílio de lâmina de bisturi esterilizada. Essa solução foi transferida para um tubo de ensaio e o inóculo obtido foi então ajustado em espectrofotômetro a uma transmitância de 80 a 85%. Logo após foi diluído em meio RPMI 1640 glicosado e tamponado a pH 7,0 com 0,165M de MOPS na concentração 1:9.

Testes isolados de suscetibilidade *in vitro*

O teste compreendeu o método de microdiluição em caldo, seguindo as normas descritas no documento M38-A2 do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) adaptado para testes com fitofármacos (CLEFF et al., 2010). O óleo de

Helianthus annus L. ozonizado e de *Eugenia cariophollata* foram obtidos comercialmente. A composição dos óleos foram fornecidos pelo fabricante. Os componentes majoritários de *Helianthus annus* L. foram: álinoleico (65%), ácido oleico (20%), ácido palmítico (5%) e ácido esteárico (5%). Eugenol na concentração de 85% foi o componente majoritário de *Eugenia cariophollata*.

A solução-estoque do óleo foi preparada adicionando-se 450.000 µg do óleo essencial em 8.000µl de RPMI e 50µl de Tween 80 obtendo a concentração de 56.000µg/mL. A partir das soluções-estoque, foram preparadas dez diluições sucessivas em meio RPMI 1640, as quais variaram de 56.000 a 0,05 µg/mL para ambos os óleos. Alíquotas de 100µL dessas diluições foram dispensadas sequencialmente nas microplacas, preenchendo os poços pertencentes às colunas numeradas de um a dez. A estas colunas foi distribuído um volume de 100µL do inóculo. Para cada teste foram utilizadas colunas controle positivo (inóculo+meio de cultura) e negativo (óleo+meio). As placas foram incubadas a 37°C em estufa orbital de agitação constante a 40 rpm, durante 48 horas. Todos os testes foram realizados em triplicata.

A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração em que não houve o crescimento de hifas. As concentrações acima da concentração inibitória mínima foram utilizadas para determinação da concentração fungicida mínima (CFM). Para isto, 100 µL da diluição foram transferidos para tubos contendo 900 µL de caldo Sabouraud, ficando incubados a 37^0C por 24 horas. A menor concentração do óleo que não evidenciou crescimento foi considerada a CFM.

Testes associados *in vitro*

A associação de *Helianthus annus* L ao óleo essencial de *Eugenia cariophollata* foi realizada frente a 20 isolados de *P. insidiosum*. Os óleos foram testados nas concentrações de 14.000 a 55 µg/mL e os testes foram realizados empregando a técnica de *cherkerboard* para microdiluição (NCCLS, 2008). Foram utilizados 50µL de RPMI 1640, 50µL do óleo de *Helianthus annus* L. e 50µL do óleo de *Eugenia cariophollata* em cada diluição, adicionado de 100µL do inóculo. A leitura levou em consideração o crescimento ou não de hifas, sendo identificada a concentração inibitória mínima (MIC). A interação foi classificada como sinérgica

(Fração de Concentração Inibitória - [FICI] ≤ 0,5), indiferente (0,5 < FICI ≥ 4) ou antagonista (FICI > 4), utilizando a seguinte fórmula: FICI = (MIC A na combinação/ MIC A) + (MIC B na combinação/ MIC B).(JOHNSON, 2004).

RESULTADOS

A suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos óleos individuais estão demonstrados na Tabela 1.

Tabela 1: Suscetibilidade *in vitro* de *Pythium insidiosum* (n=30) aos óleos de *Helianthus annus* L. e *Eugenia caryophyllata*

Óleos	CIM[1]	CIM_{50}[2]	CIM_{90}[3]
Helianthus annus L.	875-28000	3500	28000
Eugenia caryophyllata	109,37-28000	875	7000

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

Evidenciou-se que os óleos de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*. Observou-se que *E. caryophyllata* demonstrou melhor atividade antimicrobiana apresentando MIC_{50} em 875 µg/mL e MIC_{90} em 7000 µg/mL. As concentrações fungicidas mínimas (CFM) dos óleos testados foram iguais as CIM para todos os isolados *P. insidiosum.*

A suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente às combinações dos óleos de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* está demonstrada na Tabela 2. A combinação de ambos os óleos evidenciaram sinergismo em 95% (19/20) dos isolados do oomiceto e indiferença em 5% (1/20). Antagonismo não foi observado nesta combinação. Adicionalmente, evidenciou-se que a CIM nas combinações apresentou menores valores que a CIM isolada. Esses valores para *Helianthus annus* L. diminuíram de 28000 µg/mL para 109,37 µg/mL em alguns isolados. Para *E. caryophyllata,* diminuiu de 7000 µg/mL para 109,37 µg/mL na maioria dos isolados testados.

Tabela2: Perfil de suscetibilidade *in vitro* de isolados brasileiros de *P. insidiosum* (n=20) frente às combinações dos óleos de *Helianthus annus* L. (HA) *Eugenia caryophyllata* (EC)

Isolados	[1] CIM da combinação (µg/mL)		
	HA/EC	[2]FICI	[3]In
008	109,37/875	0,2	S
009	437,5/109,37	0,1	S
013	218,75/109,37	0,5	S
014	437,5/109,37	0,4	S
015	875/ 109,37	0,1	S
016	437,5/109,37	0,1	S
019	437,5/109,37	0,3	S
021	218,75/109,37	0,4	S
023	437,5/109,37	0,1	S
026	437,5/109,37	0,2	S
027	437,5/109,37	0,05	S
029	437,5/109,37	0,3	S
030	218,75/109,37	0,2	S
032	218,75/109,37	0,04	S
035	218,75/109,37	0,2	S
036	218,75/109,37	0,09	S
038	109,37/218,75	0,2	S
040	218,75/109,37	0,3	S
041	437,5/109,37	0,5	S
CBS	437,5/109,37	0,7	I

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

DISCUSSÃO

A busca por terapias e combinações de protocolos terapêuticos vem aumentando nos últimos anos devido às falhas no tratamento da pitiose. Os insucessos no tratamento da doença deve-se, em parte, às peculiaridades do micro-organismo, especialmente a ausência de ergosterol na membrana plasmática, componente alvo de ação da maioria das terapias antifúngicas disponíveis (FOIL, 1996; GROOTERS, 2003). A busca por uma terapêutica eficaz para pitiose é de extrema importância e a fitoterapia tem sido o foco de diversos estudos científicos devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas das plantas medicinais. O emprego de óleos essenciais em terapias antimicrobianas pode ser considerado um método vantajoso, pois possui menor impacto ambiental e baixa toxidade às células dos mamíferos (Fonseca et al., 2014b). Pesquisas empregando óleos essencias ou compostos bioativos se fazem necessárias, uma vez que é crescente o número de cepas de micro-organismos resistentes aos fármacos antimicrobianos (DORMAN; DEANS et al., 2000).

Nos últimos anos, pesquisas *in vitro* e *in vivo* avaliando a suscetibilidade de *P. insidiosum* aos óleos essenciais (Fonseca et al., 2015[a],[b]; VALENTE et al., 2016[a],[c]), surgiram como uma nova proposta de terapia para a pitiose.

O presente estudo avaliou a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* frente aos óleos de *H. annus* L. (óleo de girassol) e *E. caryophyllata* (óleo de cravo) isolados e em combinação. Os resultados evidenciaram que os óleos avaliados apresentaram atividade antimicrobiana sobre *P. insidiosum*, corroborando Fonseca (2011) e Fonseca et al. (2015a) que relataram a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* aos óleos essenciais de *M. piperita* e *O. vulgare*. Adicionalmente, estudos de Valente et al. (2016a) demonstraram a atividade anti-*Pyhtium* de plantas medicinais *Melaleuca alternifólia*, *Mentha piperita* e *Origanum vulgare* com CIM próximas às encontradas neste estudo.

Pesquisas avaliando a ação antimicrobiana de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* sobre *P. insidiosum* não são relatadas na literatura. Porém, o óleo de *H. annus* L. é

muito utilizado como cicatrizante (Marques et al. 2004). Os componentes majoritários desse óleo são os ácidos linoleico e oleico. Segundo estudos de Greenwary et al. (1979) o ácido linoleico é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, afetando a síntese protéica, parede celular e membranas celulares. Segundo Weiller (2015), o óleo de girassol na sua forma ozonizada foi capaz de reduzir feridas e também houve uma diminuição do processo inflamatório. Contudo, de acordo com as propriedades do óleo de girassol ozonizado e de seus compostos e considerando os resultados obtidos no presente estudo, sugere-se que ele pode contribuir no processo de redução das lesões cutâneas de pitiose.

A atividade antimicrobiana de *E. caryophyllata* tem sido amplamente estudada contra diferentes micro-organismos, entre eles: bactérias (Sabahat e Perween, 2008) fungos (PINTO et al., 2009) e parasitos (YANG et al., 2003). O principal componente desse óleo é o eugenol, um composto fenólico volátil presente nas folhas e botões florais da planta que representa 95% do óleo extraído das folhas. O eugenol junto como acetato de eugenila e o β-cariofileno representam 99% do óleo essencial (RAINA, 2001; ATTOKARAN, 2011). Segundo Delespaul et al. (2000), este componente possui atividade antimicrobiana e antifúngica.

Os óleos essenciais possuem efeitos antimicrobianos que podem ser atribuídos ao seu mecanismo de ação atuando geralmente sobre a membrana citoplasmática. Estes mecanismos envolvem a lise e a perda da integridade da membrana devido às alterações que determinam a saída de íons (hidrogênio, potássio e cálcio), gerando danos aos processos essenciais à sobrevivência da célula (DORMAN; DEANS, 2000; RAO et al., 2010).

A combinação entre os óleos de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* evidenciaram sinergismo em 95% (19/20) dos isolados de *P. insidiosum* testados. Estes resultados foram similares aos relatados por Valente et al. (2016a) que demonstraram 65% de sinergismo na combinação dos óleos essenciais de *M. piperita e O. vulgare*. Adicionalmente, Fonseca et al. (2015b) ao avaliar a combinação de *M. piperita* e *O. vulgare* na pitiose experimental associada ou não a outras terapias, sugeriram que o emprego de óleos essenciais em combinação entre si e/ou em associação com outros fármacos antimicrobianos ou imunoterapia pode se constituir numa alternativa viável de tratamento da pitiose cutânea em animais. Em outro estudo, Valente et al. (2016b) ao investigar a suscetibilidade *in vitro* de *P. insidiosum* nas combinações entre os óleos de *M. alternifolia, M. piperita* e *O. vulgare* associados ao itraconazol

evidenciaram efeitos sinérgicos na associação, sugerindo assim que a combinação entre plantas bioativas e fármacos antifúngicos podem constituir uma alternativa terapêutica a ser aplicada no controle de infecções causadas por *P. insidiosum.*

Os resultados do presente estudo permitem inferir que as CIM dos óleos de *H. annus* L. e *E. caryophyllata* diminuíram quando combinados, podendo ser empregados em associação no combate a *P. insidiosum*. Segundo Zhu et al. (2004) a combinação de dois compostos pode elevar a taxa de morte microbiana e diminuir a duração do tratamento, permitindo o uso de doses mais baixas de cada composto, reduzindo os efeitos tóxicos dos mesmos.

Os resultados obtidos somam-se aos estudos prévios que avaliaram a atividade anti-*Pythium* de óleos essenciais de plantas. Sugere-se que o emprego dos óleos de girassol e cravo, isolados ou em combinação, podem ser uma alternativa viável de tratamento da pitiose cutânea em animais. No entanto, outras pesquisas são imprescindíveis para determinar novos protocolos terapêuticos envolvendo o emprego de tais óleos.

Conclusão

P. insidiosum apresenta suscetibilidade *in vitro* aos óleos de *H. annus* L. ozonizado e *E. caryophyllata* bem como as suas combinações. Evidencia-se melhor atividade antimicrobiana do óleo essencial de *E. caryophyllata* quando avaliado isoladamente.

O acentuado efeito sinérgico das combinações dos óleos de *H. annus* L. ozonizado e *E. caryophyllata* sugerem que esta combinação deve ser considerada como uma terapia aditiva e/ou alternativa para o tratamento da pitiose.

REFERÊNCIAIS

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. Phylum Oomycota. In: _____. **Introductory Mycology**. 4.ed. New York: John Wiley & Sons, 1996. p. 683-73.

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

ARGENTA, J.S., ALVES, S.H., SILVEIRA, F., MABONI, G., ZANETTE, R.A., CAVALHEIRO, A. S., PEREIRA, P. L., PEREIRA, D.I.B., SALLIS, E.S.V., POTTER, 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*. **Vet. Microbiol**. 157:137-142. 2012.

ATTOKARAN, M. Natural food flavors and colorants. USA: Blackwell Publishing Ltd. and Institute of Food Technologists, p. 145, 2011.

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

BOCCI, V.; LUZZI, E.; CORRADESCHI, F. et al. Studies on the biological effects of ozone 6.Production of transforming growth factor by human blood after ozone treatment. **J. Biol. Regul. Homeost. Agents** 8: 108-12, 1994.

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

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

CARMO, P. M. S.; PORTELA, R. A.; SILVA, T. R.; OLIVEIRA FILHO, J. C.; RIET-CORREA, F. Cutaneous pythiosis in a goat. **Journal of Comparative Pathology**. In Press Correct Proof. 2014.

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

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

CHAFFIN, M.K.; SCHUMACHER, J.; MCMULLAN, W.C. Cutaneous pythiosis in the horse. Veterinary Clinics of North America: **Equine Practice**. V. 11, n. 1, p. 91-103, 1995.

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

DELESPAUL, Q.; BILLERBECK, V.G.; ROQUES, C.G.; MICHEL, G.; MARQUIER-VINUALES, C.; BESSIERE, J.M. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods**. Jounal of Essential** Oil Research, Carol Stream. V. 12, n.2, p. 256-266, Mar 2000.

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

DYKSTRA, M.J.; SHARP, N. J. H.; 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, p. 427–433, 1999.

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

FONSECA , A.O. **Ação antifúngica dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Pythium insidiosum* e Dermatófitos.** 2011.42f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós – Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2011.

FONSECA et al. *In vitro* susceptibility of zoospores and hyphae of *Pythium insidiosum* to antifungals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 69, n.6, p.1564-1567, jun. 2014a.

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

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

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

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

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

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

Greenway DLA, Dyke KGH. Mechanism of the inhibitory action of linoleic acid on the growth of Staphylococcus aureus. **J Gen Microbiol**. ;115(1):233-45. 1979

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

GRIFFITHS, S.P. The use of clove oil as an anaesthetic and method for sampling intertidal rockpool fishes. J. **Fish Biol**. , London, v. 57, p. 1453-1464, 2000.

HISANO, H.; ISHIKAWA, M. M.; FERREIRA, R. A.; BULGARELLI, A. L. A.; COSTA, T. R.; PÁDUA, S.B. Tempo de indução e de recuperação de dourados Salminus brasiliensis (Cuvier, 1816), submetidos a diferentes concentrações de óleo de cravo *Eugenia sp*. **Sistema de Información Científica**. v. 30, n. 3, p. 303-307, 2008

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

JESUS, F. P. K; FERREIRO, L.; BIZZI, K. S.; LORETO, E. S.; PILOTTO, M. B.; LUDWIG, A.; ALVES, S. H.; ZANETTE, R. A.; SANTURIO, J. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Micologie Médicale**, 2014a.

JESUS, F. P. K; FERREIRO, L.; LORETO, E. S.; PILOTTO, M. B.; LUDWIG, A.; BIZZI, K.; TONDOLO, J. S. M.; ZANETTE, R. A.; ALVES, S. H.; SANTURIO, J. M. In vitro synergism observed with azithromycin, clarithromycin, minocycline or tigecycline in associatin with antifungal agentes againt *Pythium insidiosum.* **Antimicrobial Agents and Chenotherapy**, v. 58, p. 5621-5625, 2014b.

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

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

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

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

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

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

MARQUES, S.R.; PEIXOTO, C.A.; MESSIAS, J.B. et al. The effects of topical application of sunflower-seed oil on open wound healing in lambs. **Acta. Cir. Bras.** 19(3): 196-209, 2004.

MCMULLAN, W.C.; JOYCE, J.R.; HANSELKA, D.V.; HEITMANN, M. Amphotericin B for the treatment of localized subcutaneous phycomycosis in the horse. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. V. 170, p. 1293-1297, 1977.

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

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

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

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

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

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

PEREIRA, D.I.B.et al.; Caspofungin in vitro and in vivo activity against Brazilian *Pythium insidiosum* strains isolated from animals. **Journal of Antimicrobian and Chemother**. 60, 1168–1171. 2007.

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

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

PESSOA, C. R. M.; RIET-CORREA, F.; PIMENTEL, L. A.; GARINO JR, F.; DANTAS,A.F.M.; KOMMERS,G.D.; TABOSA, I.M.; REIS-JÚNIOR,J.L. Pythiosis of the digestive tract in sheep. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. V.24, p.1133–1136, 2012.

PETRIKKOS, V., SKIADA, A., Recent advances in antifungal chemotherapy**. J Antimicrob Agents**, 2007.

PINTO, E.; VALE-SILVA, L.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medical Microbiology**, v. 58, p. 1454-1462, 2009.

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

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

RAINA, V.K.; SRIVASTAVA, S.K.; AGGARWAL, K.K.; SYAMASUNDAR, K.V.; KUMAR, S. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, n°. 5, p. 334-336, 2001.

ROSA, R.L.; BARCELOS, A.L.V. and BAMPI, G. Investigação do uso de plantas medicinais no tratamento de indivíduos com diabetes melito na cidade de Herval D' Oeste - SC. **Rev. bras. plantas medicinais**. 2012, vol.14, n.2, pp. 306-310.

SABAHAT, S, Perween T. In Vitro Antibacterial Activity Of Clove Against Gram Negative Bacteria. **Pakistan Jourrnal of Botany**.40(5):2157-2160, 2008.

SANCHEZ, C. M. S; **A utilização do óleo ozonizado para o tratamento tópico de lesões em porquinhos da índia (*Cavia porcellus*) – relato de caso**.38f. Trabalho monográfico de conclusão do curso, Universidade Castelo Branco, Brasil, 2008.

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

SANTURIO, J.M.; ALVES, S.H.; PEREIRA, D.B.; ARGENTA, J.S. Pitiose: uma micose emergente. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.34, p.1-14, 2006.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M. C. T.; GODOY, H. T. **Rev. Bras. Plantas Med**. 11, 442, 2009.

SCHWARTZ, A; KONTORSCHIKOVA, C. N.; MALESNIKOV, O. V.; SÁNCHEZ, G. M.; RE, L.; GRIBKOVA, I. A. Guía para el uso médico del ozono - Fundamentos terapéuticos e indicaciones. 1. ed. Madrid: **Artes Gráficas**, 2011.

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

Silva SB, Luvielmo MM, Geyer MC, Prá I. Potential use of ozone in the food processing. **Semina: Ciências Agrárias**. 2011; 32:659-682.

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

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

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

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

SUPABANDHU, J. Isolation and identification of the human pathogen *Pythium insidiosum from environmental samples collected in Thai agricultural areas.* ***Medical Mycology,*** v.46, n.1, p. 41-52, 2008***.***

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

TRAINA, A.A., NOGUEIRA, R., URRUCHI, W., CORRÊA, L., DEBONI, M.C.Z. Estudo morfométrico da reparação tecidual em ratos após irrigação com água ozonizada. Apostila do curso de ozonioterapia, março de 2008.

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

TEIXEIRA, L. R.; LUNA S. P. L.; TAFFAREL, M. O.; LIMA A. F. M.; SOUSA, N. R.; JOAQUIM, J. G. F.; FREITAS, P. M. C. Comparision of intrarectal ozone, ozone administered in acupoints and meloxicam for postoperative analgesia in bitches undergoing ovariohysterectomy. **The Veterinary Journal**, v. 197, n. 3, p. 794-799, 2013.

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

VALENTE J.S.S., FONSECA A.O.S., DENARDI L.B., DAL BEN V.S., MAIA FILHO F.S., BRAGA C.Q., ZAMBRANO C.G., ALVES S.H, BOTTON S.A., PEREIRA DIB*. In vitro* activity of antifungals in combination with essential oils against the oomycete *Pythium insidiosum.* **Accepted Article**. 2016b.

VALENTE J.S.S., FONSECA A.O.S., BRASIL. C.L., SAGAVE L., FLORES F.C., SILVA C.B., SANGIONE L.A., PÖTTER L., SANTURIO J.M., BOTTON S.A., PEREIRA DIB*. In Vitro* Activity of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) in Its Free Oil and Nanoemulsion Formulations Against *Pythium insidiosum.* **. Mycopathologia.** 2016c.

VELANO HE, Nascimento LC, Barros LM, et al. Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana da água ozonizada frente ao *Staphylococcus aureus***. Pesquisa Odontológica Brasileira**.; 15: 18-22, 2001.

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

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

WEILLER, C.M.B.; Tratamento de feridas diabéticas em membros inferiores com óleo de girassol 72f. Tese de Mestrado em Bioengenharia , Universidade Camilo Castelo Branco, Brasil, 2013.

YANG, B.H. et al. Activation of vanilloid receptor 1(VR1) by eugenol. **Journal of Dental Research**, v.82, p.781-785, 2003.