

RODRIGO TROLEZI

**Efeito do ácido tânico purificado (tanino)
sobre o crescimento *in vitro* de isolados de
*Pythium insidiosum***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário.

Preceptor: *Profa. Adj. Dra. Regina Kiomi Takahira*
Co-orientador: *Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco*

Botucatu

2011

RODRIGO TROLEZI

**Efeito do ácido tânico purificado (tanino)
sobre o crescimento *in vitro* de isolados de
*Pythium insidiosum***

Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação apresentado
à Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade
“Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Botucatu, SP,
para obtenção do grau de médico veterinário.

Área de concentração: *Clínica Veterinária*

Preceptor: *Profa. Adj. Dra. Regina Kiomi Takahira*

Co-orientador: *Profa. Dra. Sandra de Moraes Gimenes Bosco*

Coordenador dos estágios: *Jane Megid*

Botucatu

2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Trolezi, Rodrigo.

Efeito do ácido tânico purificado (tanino) sobre o crescimento *in vitro* de isolados de *Pythium insidiosum* / Rodrigo Trolezi. – Botucatu : [s.n.], 2011

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Medicina Veterinária) -
Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia
Orientador: Regina Kiomi Takahira
Orientador: Sandra de Moraes Gimenes Bosco
Capes: 50500007

1. Doenças infecciosas - Tratamento. 2. Taninos. 3. Micologia veterinária.

Palavras-chave: Ácido tânico; Barbatimão; Pitiose; *Pythium insidiosum*;
Tratamento.

TROLEZI, RODRIGO. Efeito do ácido tânico purificado (tanino) sobre o crescimento *in vitro* de isolados de *Pythium insidiosum*. Botucatu, 2011. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de concentração: Clínica médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

RESUMO

A pitiose é uma doença causada por um oomiceto denominado *Pythium insidiosum* e acomete animais domésticos, silvestres e o homem.

A presença de água e vegetais é fundamental para que o patógeno complete seu ciclo. Sua forma infectante são os zoósporos biflagelados.

Em geral, os indivíduos acometidos apresentam lesões de aspecto granulomatoso, as quais frequentemente sofrem infecções secundárias na pele e tecido subcutâneo. Pode haver também comprometimento interno, de diversos órgãos, secundários a processos externos ou mesmo de forma primária. Os sinais clínicos manifestados variam de acordo com a região acometida.

O diagnóstico é tradicionalmente baseado na associação das manifestações clínicas com exames histopatológicos e isolamento do agente, podendo ser utilizada também técnicas de imunodiagnóstico. Recentemente as técnicas de biologia molecular foram introduzidas como uma forma sensível, específica e rápida para um diagnóstico conclusivo.

O tratamento da pitiose é difícil sendo necessária a intervenção cirúrgica, quando possível, porém, dependendo da localização e extensão da lesão, tal procedimento é inviável e as recidivas são frequentes.

Em virtude das alterações climáticas, as quais promovem o aumento da incidência desta doença, faz-se necessária a pesquisas por novos protocolos terapêuticos.

Palavras-chave: Ácido tânico; Barbatimão; Pitiose; *Pythium insidiosum*; Tratamento.

TROLEZI, RODRIGO. Efeito do ácido tânico purificado (tanino) sobre o crescimento *in vitro* de isolados de *Pythium insidiosum*. Botucatu, 2011. 20p. Trabalho de conclusão de curso de graduação (Medicina Veterinária, Área de concentração: Clínica médica) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

ABSTRACT

Pythiosis is caused by the oomycetous *Pythium insidiosum* and affect domestic and wild animals and man.

The presence of water and vegetal material is fundamental for its life cycle in nature. The biflagellate zoospore are the infective form of this pathogen.

The lesions are generally of granulomatous aspect, which frequently may be contaminated by secondary bacterial infection in skin and subcutaneous tissue. Dissemination to systemic tissues may also occur and it may be due to the spread of the pathogen from cutaneous lesions, as well as a primary source of infection. Clinical signs depend on the affected tissue.

Diagnosis of pythiosis is based on the clinical manifestations, histopathological sections and culture of the pathogen. Serological tests may also be employed and more recently molecular biology has been introduced as a sensitive, specific and a rapid method for conclusive diagnosis.

Treatment is often difficult and extensive surgery procedures are required, however, depending on the anatomic region and size of the lesion, such procedure is unfeasible and relapses are frequent.

Due to the climate changes, which has contributed to increase the incidence of pythiosis, it is necessary the search for new therapeutic protocols.

Key words: Barbatimão; Pythiosis; *Pythium insidiosum*; Tannin acid; Treatment.

SUMÁRIO

1) Introdução.....	5
2) Filogenia e características do agente	5
3) Epidemiologia.....	6
4) A pitiose.....	6
4.1) Equinos	7
4.2) Cães e gatos	8
4.3) Ruminantes	8
4.4) Animais silvestres.....	9
4.5) Humanos	9
5) Diagnóstico.....	9
6) Tratamento.....	10
7) Busca por novos tratamentos.....	11
7.1) Aquisição do ácido tânico purificado	12
7.2) Isolados avaliados e manutenção das culturas.....	12
7.3) Padronização do inóculo.....	13
7.4) Testes de sensibilidade	14
7.5) Resultados obtidos	14
8) Conclusão	17
9) Referências bibliográficas	18

1) Introdução

A pitiose, doença de grande incidência em clima tropical e subtropical é causada pelo *Pythium insidiosum*, afetando mamíferos e também aves (MENDOZA et al., 1993, PESAVENTO et al., 2008).

A doença em geral caracteriza-se pela presença de lesões de aspecto granulomatoso que pode provocar infecções secundárias na pele e tecido subcutâneo. Em cães, a manifestação mais comum é a gastrointestinal, observando-se formação de piogranulomas, frequentemente associados a quadros de vômitos, anorexia, perda de peso e diarreia.

O diagnóstico é tradicionalmente baseado na associação das manifestações clínicas com exames histopatológicos e isolamento do agente, podendo ser utilizada também técnicas de imunodiagnóstico (KAUFFMAN, 1998).

Até o momento não há tratamento efetivo sobre o agente. O uso de antifúngicos convencionais é ineficaz uma vez que o *P. insidiosum* apresenta características estruturais que o diferem dos fungos verdadeiros. A intervenção cirúrgica é o procedimento de eleição, com retirada de margem cirúrgica, porém tal procedimento torna-se inviável dependendo da região anatômica acometida e da extensão da lesão. As recidivas são comuns e bons resultados são adquiridos apenas em pequenas lesões superficiais (MILLER, 1981).

2) Filogenia e características do agente

Pythium insidiosum pertence ao reino Stramenopila (compreende microorganismos não fúngicos que apresentam características morfológicas e ecológicas semelhantes aos fungos), classe Oomycetes, ordem Pythiales, família Pythiaceae e gênero *Pythium* (ALEXOPOULOS et al., 1996). Tal gênero apresenta mais de 120 espécies, sendo a grande maioria habitante de solos e patógenos de vegetais. *Pythium insidiosum* é a única espécie deste gênero, descrita até o momento, capaz de causar doença em mamíferos e também em aves (MENDOZA et al., 1993).

Dentre as características dos membros desta classe estão a produção de zoósporos biflagelados durante a reprodução assexuada, talo diplóide e parede celular composta de beta glucana, celulose e hidroxiprolina (ALEXOPOULOS et al., 1996).

A distância taxonômica entre os oomicetos e os fungos está retratada ao nível celular através de diferenças na parede e composição da membrana plasmática. A quitina, componente essencial da parede celular fúngica, está geralmente ausente nos oomicetos, que apresentam como componentes predominantes celulose e beta-glucana. Ainda, o ergosterol não é o principal esteróide na membrana celular, como ocorre com os fungos. O gênero *Pythium* possui esteróides auxotróficos, ou seja, incorporam os esteróides do ambiente ao invés de produzirem (GROOTERS, 2003).

3) Epidemiologia

A pitiose ocorre em regiões de clima tropical, subtropical e temperado, tendo sido relatada nas Américas, alguns países europeus, Ásia e África (MENDOZA et al., 1993, TRISCOTT, 1993). Não há predisposição sexual, racial ou por faixa etária. A fonte de infecção são os zoósporos presentes no ambiente aquático, não apresentando relatos de transmissão direta entre indivíduos acometidos (MENDOZA et al., 1996). Segundo estudo realizado por Miller e Campbell (1982), para a produção dos zoósporos são necessárias temperaturas próximas de 30°C e o acúmulo de água em banhados e lagoa.

Seu ciclo ecológico baseia-se na colonização de plantas aquáticas que servem de substrato para o desenvolvimento e reprodução do organismo, formando os esporângios que contém em seu interior os zoósporos biflagelados, os quais correspondem à forma infectante do patógeno. Estes, livres na água, movimentam-se até encontrar outra planta ou animal com tecido injuriado, onde se encistam e emitem tubo germinativo, dando origem a uma nova hifa, a qual corresponde a forma invasiva do patógeno e responsável por causar a lesão (MENDOZA et al., 1993). Estudos discutem a possibilidade da penetração dos zoósporos a partir da pele íntegra, sendo atraídos pelo folículo piloso, o qual corresponderia à porta de entrada do patógeno (SANTURIO *et al.*, 1998).

4) A pitiose

Esta doença, também conhecida como hifomicose, granuloma ficomicótico “swamp cancer” (nos Estados Unidos) e “ferida da moda” (na região do pantanal

Matogrossense), é caracterizada pela presença de lesões com aspecto granulomatoso que afeta principalmente a espécie equina, provocando quadro infeccioso na pele e tecido subcutâneo. Nos cães, segunda espécie mais acometida, em geral há formação de piogranulomas intestinais e cutâneo-subcutâneos (GROOTERS, 2003). Acomete também felinos, ruminantes, aves e animais selvagens.

4.1) Equinos

Os eqüinos são os animais mais acometidos, devido o ambiente em que estão presentes.

Nesta espécie, as lesões cutâneas são as mais frequentes, atingindo principalmente as extremidades distais dos membros e porção ventral da parede toracoabdominal. Os sinais clínicos caracterizam-se por lesões ulcerativas granulomatosas, formando massas com bordas irregulares. Há presença de hifas recobertas por células necróticas, que formam massas branco-amareladas denominadas “kunkers”. Secreções serossanguinolenta, mucossanguinolenta, hemorrágica ou mucopurulenta podem fluir através dos sinus da lesão. Devido ao intenso prurido, normalmente são visíveis sinais de mutilação no local da lesão e quando se compromete membros, observa-se claudicação.

A forma intestinal também está presente nos eqüinos, e os animais acometidos apresentam episódios de cólica devido à obstrução do lúmen intestinal.

Ainda, outros órgãos e tecidos podem ser acometidos secundariamente. Pode ocorrer a presença de lesões, por exemplo, em ossos adjacentes às lesões cutâneas crônicas, caracterizadas no exame radiológico por exostoses, osteólises e osteomielite (MENDOZA et al, 1988).

Na Universidade Federal de Minas Gerais foram relatados três casos de pitiose equina disseminada sistemicamente a partir de uma lesão subcutânea. Em geral, nos achados de necropsia foram encontradas lesões granulomatosas multifocais e encapsuladas no fígado, pulmão e baço, com presença da hifa do patógeno. Tal disseminação pode ser possível nos casos crônicos da doença e foi constatada através de análise específica, incluindo reação de amplificação de gene 18S da região do DNA ribossomal (REIS et al., 2003).

4.2) Cães e gatos

Os cães correspondem à segunda espécie mais acometida pela pitiose, podendo ser encontrada na forma cutânea e mais comumente na gastrintestinal, apresentando distúrbios digestivos como anorexia, emese, diarreia, perda de peso. À palpação abdominal, muitas vezes, é possível constatar a presença de massas nodulares (GROOTERS, 2003). Em geral, estes animais são oriundos de locais rurais ou permaneceram por um período de tempo em locais alagados (DYKSTRA et al., 1999). O trato digestivo superior também pode ser comprometido pela doença.

As lesões caracterizam-se por formação de grandes massas nas paredes dos órgãos, compostas por inflamação granulomatosa e piogranulomatosa com áreas de necrose e intenso infiltrado eosinofílico, além de presença de hifas (FISCHER et al., 1994).

O primeiro caso de pitiose canina no Brasil foi relatado por Larsson e colaboradores, no ano de 1997. O animal apresentava lesão cutânea no membro posterior direito.

A pitiose em gatos é rara, apresentando poucos casos nos Estados Unidos, e as manifestações clínicas incluem lesões retrobulbares e manifestações gastrointestinais (RAKICH et al., 2005). Até o momento nenhum caso foi relatado no Brasil.

4.3) Ruminantes

Nos ruminantes a pitiose é mais comum em ovinos, sendo menos frequente em bovinos. Geralmente estes animais apresentam lesões cutâneas, mas há relatos de outras regiões acometidas.

Uma ovelha da raça Santa Inês foi diagnosticada, em exame post-mortem, com rinite granulomatosa associada à infecção por *P. insidiosum* (SANTURIO et al., 2008). Na região semi-árida do nordeste, dois surtos de pitiose cutânea em ovinos foram descritos. Em um rebanho, quarenta dos cento e vinte animais foram afetados. Observaram-se lesões ulceradas nos membros e abdome. Nos achados de necropsia de três animais foi constatada metástase pulmonar caracterizada por nódulos multifocais e em um deles a lesão cutânea atingiu o osso sesamóide. No exame microscópico foi detectada a presença de granulomas multifocais contendo hifas de *P.*

insidiosum. O diagnóstico foi baseado na análise histopatológica, imunohistoquímica e cultura do agente etiológico (TABOSA et. al, 2004).

4.4) Animais silvestres

Em animais selvagens a literatura sobre a ocorrência de *P. insidiosum* é bem recente, sendo relatado caso de pitiose abdominal em tigre de bengala (BUERGELT et al., 2006), lesões em face e estômago em dromedário (WELLEHAN et. al, 2004), lesões em vulva em camelos (VILELA et al., 2011) e lesão subcutânea em ave (PESAVENTO et al., 2008). As características das lesões assemelham-se as descritas anteriormente e estes animais habitavam locais que propiciavam o ciclo reprodutivo do patógeno.

4.5) Humanos

No homem, a doença é comum no sudeste da Ásia, principalmente na Tailândia, podendo também ser encontrada nas Américas, países europeus, e Oceania, manifestando lesões cutâneas e subcutâneas de natureza granulomatosa ou mesmo lesões oculares, como ceratites e úlceras de córnea. Outra manifestação clínica da doença humana é a sistêmica ou vascular, considerada a de maior gravidade por resultar na oclusão dos vasos e/ou aneurisma (TRISCOTT, 1993).

O primeiro relato de caso no Brasil foi realizado por BOSCO et. al. (2005), em um paciente que desenvolveu lesão em membro inferior, após realizar atividade de pesca. O diagnóstico definitivo de pitiose foi concluído somente após o sequenciamento da região ITS-5.8S do rDNA da cultura obtida a partir dos fragmentos da lesão (BOSCO et al., 2005, MARQUES et al., 2006).

5) Diagnóstico

O diagnóstico da pitiose é tradicionalmente baseado na associação das manifestações clínicas com exames histopatológicos e isolamento do agente.

Em cortes histológicos, observa-se que o *P. insidiosum* cora-se bem pelas técnicas de Gomori-Grocott e PAS, evidenciando hifas largas, ramificadas e esparsamente septadas, características comuns também de fungos zigomicetos

(KAUFFMAN, 1998). Os “kunkers” apresentam-se como concreções eosinofílicas de tamanho variado e forma circular com contornos irregulares, e são vistos apenas nos equinos.

O isolamento do agente pode ser realizado através da cultura de “kunkers” ou tecido infectado em Ágar Sabouraud. Estes devem ser previamente colocados em solução contendo antibiótico, para minimizar contaminação bacteriana. O crescimento típico é observado cerca de 24 horas após a semeadura e a identificação do *P. insidiosum* pode ocorrer por meio de aspecto da colônia, característica das hifas e produção dos esporângios e zoósporos em meio adequado (GROOTERS, 2003).

A imunohistoquímica e a sorologia, como ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) e ID (Imunodifusão), são técnicas complementares para auxiliarem no estabelecimento do diagnóstico, principalmente quando não é possível a obtenção do patógeno em cultura. (MENDOZA et al., 1996).

O seqüenciamento gênico a partir da amplificação do DNA ribossomal, região *ITS1-5.8S-ITS2*, por meio de PCR também é considerada importante ferramenta para detecção e identificação de *P. insidiosum*. (GROOTERS & GEE, 2002).

6) Tratamento

Por diferir estruturalmente dos fungos verdadeiros (ALEXOPOULOS, 1996), o tratamento com antifúngicos convencionais não é eficaz contra o *P. insidiosum*.

Em geral, a intervenção cirúrgica é o procedimento de eleição, retirando-se a região afetada com ampla margem de segurança. Entretanto, este procedimento limita-se a regiões que não comprometam o indivíduo. As recidivas são comuns e bons resultados são adquiridos apenas em pequenas lesões superficiais (MILLER, 1981).

A imunoterapia tem sido estudada como tratamento alternativo nos casos de pitiose. Duas formulações de vacinas foram desenvolvidas e comparadas, uma tendo como antígeno a massa celular e outra um antígeno solúvel concentrado. Ambas apresentaram cerca de 60% de eficácia em cavalos com lesões adquiridas em menos de dois meses (MENDOZA et. al, 1992). Apesar disso, não há conhecimento completo dos mecanismos envolvidos na infecção por *P. insidiosum*. As explicações para a cura induzida pela imunoterapia são apenas propostas baseadas em

características clínicas. Segundo Miller (1981), as hifas do patógeno não são completamente reconhecidas pelo hospedeiro devido a extensa reação inflamatória (MILLER, 1981). Mendoza e colaboradores (1996) acreditam que a resposta celular seja o principal mecanismo envolvido na cura da doença. Na patogenia das lesões da pitiose equina observa-se que existe o predomínio de uma reação eosinofílica, a qual é originária da secreção de exoantígenos pela hifa do patógeno no tecido, induzindo a liberação de interleucina-4 (IL-4) que induz a diferenciação de linfócitos para o padrão T helper 2 (Th2). Os antígenos presentes no imunógeno induzem a mudança de resposta imunológica com predomínio de células mononucleares e perfil Th1, a qual estimula a produção de interleucina-2 e interferon-gama, ativando macrófagos e IgG, resultando na ativação do sistema complemento e destruição do patógeno (MENDOZA et. al., 1996).

Uma vez que ainda não há um tratamento eficaz, deve-se estimular a realização de pesquisas visando determinar componentes que consigam exercer efeito fungicida no patógeno. A abordagem de produtos naturais deve ser estimulada, uma vez que diversas pesquisas comprovaram a ação dos mais variados óleos e extratos naturais de plantas medicinais sobre bactérias, fungos, bem como protozoários (MAZA et. al, 2003).

7) Busca por novos tratamentos

As plantas já demonstraram ter atividades medicinais no passado e continuam sendo estudadas com finalidades terapêuticas até os dias de hoje. Segundo a Organização Mundial de Saúde, ao menos 60% da população mundial que vive em países subdesenvolvidos dependem essencialmente de plantas medicinais para realizarem os primeiros cuidados com a saúde (PAULA, 2009).

Inúmeras pesquisas científicas apontam o extrato de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) como um dos principais fitoterápicos de efetiva ação contra diversos agentes microbiológicos. Autores indicam que o principal responsável pelo efeito farmacológico é o ácido tânico ou tanino, que se apresenta em maior concentração na casca do “barbatimão” (MELLO et al., 1996).

Em pesquisa realizada durante os anos de 2010 e 2011 (Projeto de Iniciação Científica FAPESP nº 09/18466-0), observou-se que os extratos das folhas e da casca

de barbatimão são efetivos na inibição do crescimento *in vitro* das hifas de diferentes isolados de *P. insidiosum*, em concentrações que variam de 3 a 5 mg/mL, sendo detectado os menores valores quando da utilização do tratamento cuja matéria-prima fora a casca da árvore.

Em decorrência de fatores ambientais, principalmente relacionados com a escassez ou excesso de água, observa-se variação nos teores de tanino e de outros compostos presentes nesta planta. O clima quente e úmido propicia o desenvolvimento de novas folhas e flores, mas também favorece a proliferação de insetos e micro-organismos patogênicos, sendo necessária maior produção de ácido tânico e outros fenóis que atuam como mecanismo de defesa endógena (HORNER *et al.*, 1990). Para uso medicinal, as cascas devem ser coletadas na época das chuvas, uma vez que há maior teor de compostos ativos, principalmente tanino (SANTOS *et al.*, 2006).

Desta forma, objetiva-se realizar análises adotando-se o tratamento com o ácido tânico purificado sobre alguns isolados de *P. insidiosum*, seguindo a metodologia aplicada anteriormente e descrita a seguir.

7.1) Aquisição do ácido tânico purificado

O ácido tânico empregado nos ensaios foi o da Sigma-Aldrich (nº. catálogo 16201), veiculado em forma de pó. Para a utilização como tratamento foi diluído em álcool absoluto, em concentração de 100mg/mL.

7.2) Isolados avaliados e manutenção das culturas

Avaliaram-se 4 isolados de *P. insidiosum*, sendo 3 provenientes de equinos atendidos no Hospital Veterinário da Faculdade de Medicina Veterinária da UNESP Campus de Botucatu, e um do primeiro caso de pitiose humana registrado no país, como sumarizado no **Quadro 1**. Estes isolados foram subcultivados quinzenalmente em tubos contendo Agar Sabouraud e mantidos à temperatura de 25°C.

Quadro 1: Isolados de *P. insidiosum* empregados nos testes de sensibilidade ao ácido tânico, de acordo com a espécie animal envolvida e procedência.

Isolados	Espécie	Procedência
<i>P. insidiosum</i> 1 (B01)	humana	Paraguaçu Paulista/SP
<i>P. insidiosum</i> 3 (EQ3)	equina	Jaú/SP
<i>P. insidiosum</i> 4 (EQ4)	equina	Barra Bonita/SP
<i>P. insidiosum</i> 5 (EQ5)	equina	Itápolis/SP

7.3) Padronização do inóculo

As análises foram realizadas utilizando-se colônias de *P. insidiosum* com sete dias, cultivadas em placa de Petri contendo Agar Sabouraud, a 35 °C. Destas, foram retirados os inóculos que permaneceram em microtubos contendo uma solução composta do ácido tânico purificado diluído em caldo Sabouraud, em diferentes concentrações.

A Padronização dos inóculos foi realizada com o auxílio de ponteiras de 1000 µL cortadas com diâmetro de 5 mm, cujas medições foram feitas utilizando-se uma régua. Tais etapas para a confecção dos moldes são ilustradas na **Figura 1** enquanto a **Figura 2** ilustra a aplicação de tais moldes para a obtenção dos inóculos com a medida desejada.

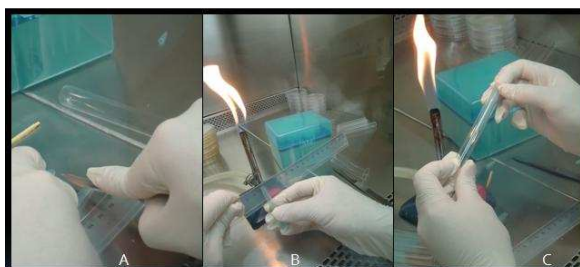


Figura 1: Etapas para a confecção das ponteiras-moldes com 5 mm de diâmetro. **A)** corte da ponteira com auxílio de lâmina de bisturi, **B)** medição do diâmetro após o corte com o auxílio de uma régua, **C)** armazenamento da ponteira-molde em tubo de ensaio para posterior esterilização.

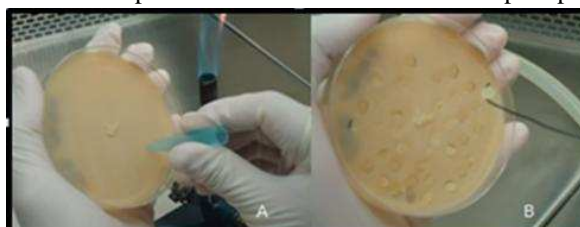


Figura 2: Procedimento realizado para a obtenção dos inóculos de 5 mm de diâmetro a partir da utilização das ponteiras-moldes. **A)** momento em que se aplica a ponteira-molde na placa contendo o isolado para obtenção de inóculos de 5 mm de diâmetro, **B)** retirada dos fragmentos da placa de Petri, separando-os do Agar Sabouraud.

7.4) Testes de sensibilidade

Testes de sensibilidade dos isolados de *Pythium insidiosum* frente ao ácido tânico purificado foram realizados com o intuito de obter faixas de concentrações inibitórias prováveis.

Foram utilizadas as concentrações de 0,5; 1; 1,5 e 2 mg em volume final de 1 mL. Adotou-se um grupo controle positivo, contendo as mesmas alíquotas de álcool absoluto utilizado no grupo tratamento e um grupo controle negativo, contendo apenas caldo Sabouraud. A **Tabela 1** representa as alíquotas utilizadas para o experimento.

Tabela 1: Relação do volume (μL) da solução do ácido tânico purificado (100mg/mL álcool absoluto) e caldo sabouraud, bem como da concentração final em mg/mL do grupo tratamento.

Alíquota da solução do ácido tânico (100 mg/mL) em μL	Alíquota do caldo Sabouraud e de etanol absoluto em μL	Concentração em mg/mL do ácido tânico purificado usado no tratamento
5	995	0,5
10	990	1
15	985	1,5
20	980	2
-	1000	-

Os inóculos de *P. insidiosum* (fragmentos padronizados de 5mm de diâmetro) foram introduzidos nos microtubos e permaneceram submersos por 24 horas, sob homogeneização constante a 35°C. Posteriormente, os fragmentos foram semeados em placas de Petri contendo Agar Sabouraud e observados diariamente por um período de 7 dias, para avaliação do crescimento. Foram realizadas 5 repetições paracada isolado e concentração avaliada. Os ensaios foram registrados na Seção de Fotografia da UNESP/Botucatu, com 48 e 168 horas e as mensurações das hifas foram realizadas com o auxílio do software gratuito “ImageJ”, calculando-se a área de crescimento das mesmas. Ao fim de todas as análises, determinou-se a faixa de concentração inibitória, as quais foram variáveis segundo cada isolado testado.

7.5) Resultados obtidos

As **Figuras 3, 4, 5 e 6** representam o crescimento das colônias após um período de 168 horas, para o grupo tratamento, controle positivo e controle negativo.

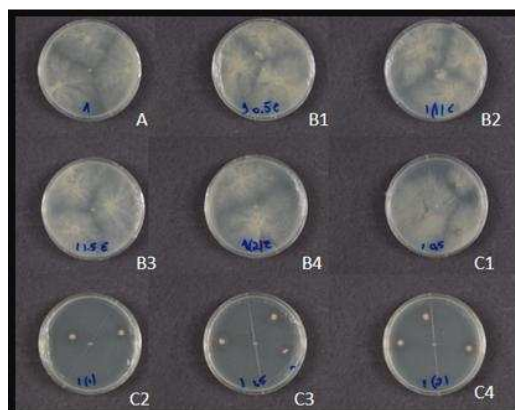


Figura 3: Crescimento das colônias do isolado B01 com 168 horas. **A)** controle, **B)** controle positivo – álcool absoluto, **C)** tratamento com ácido tânico. Os números **1, 2, 3 e 4** representam no grupo B as alíquotas de álcool utilizadas e no grupo C as concentrações do tratamento (0,5; 1; 1,5; 2 mg/mL), respectivamente.

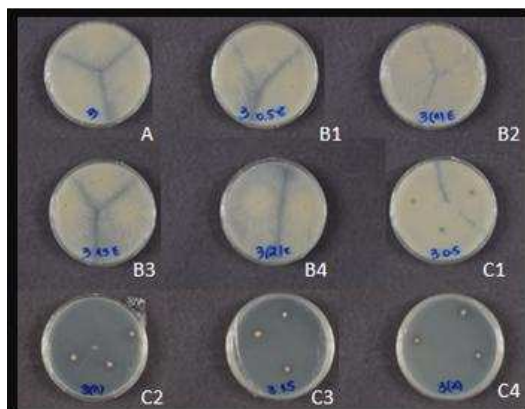


Figura 4: Crescimento das colônias do isolado EQ3 com 168 horas. **A)** controle, **B)** controle positivo – álcool absoluto, **C)** tratamento com ácido tânico. Os números **1, 2, 3 e 4** representam no grupo B as alíquotas de álcool utilizadas e no grupo C as concentrações do tratamento (0,5; 1; 1,5; 2 mg/mL), respectivamente.



Figura 5: Crescimento das colônias do isolado EQ4 com 168 horas. **A)** controle, **B)** controle positivo – álcool absoluto, **C)** tratamento com ácido tânico. Os números **1, 2, 3 e 4** representam no grupo B as alíquotas de álcool utilizadas e no grupo C as concentrações do tratamento (0,5; 1; 1,5; 2 mg/mL), respectivamente.



Figura 6: Crescimento das colônias do isolado EQ5 com 168 horas. **A)** controle, **B)** controle positivo – álcool absoluto, **C)** tratamento com ácido tânico. Os números **1, 2, 3 e 4** representam no grupo B as alíquotas de álcool utilizadas e no grupo C as concentrações do tratamento (0,5; 1; 1,5; 2 mg/mL), respectivamente.

Pelas imagens podemos observar que transcorridos sete dias, observa-se efeito fungicida do ácido tânico em concentração de 1mg/mL para três dos quatro isolados avaliados. Apenas o isolado EQ5 teve sua inibição total na concentração de 1,5 mg/mL. Estes resultados são coerentes com os detectados no estudo com os extratos da casca e das folhas de barbatimão, uma vez que foram necessárias 4mg/mL do extrato da casca e 5mg/mL das folhas para a inibição total das hifas dos isolados B01, EQ3 e EQ4, enquanto para o EQ5 foram necessários cerca de 5mg/mL do extrato da casca e 6mg/mL das folhas, para obtenção do mesmo efeito. Dessa forma, podemos ao menos questionar de forma positiva o efeito do tanino, sendo seu efeito 4 vezes superior, quando comparado com os extratos. Ressalta-se que a faixa inibitória do crescimento foi aquela em que houve ausência de desenvolvimento do agente em todas as repetições.

Segundo um estudo semelhante realizado com antifúngicos convencionais, concentrações inferiores a 0,1mg/mL foram suficientes para reduzir o desenvolvimento das hifas de seis isolados de *P. insidiosum* (BROWN et al., 2008). Estes resultados foram avaliados após um período de 48 horas, período este, que por nós é claramente observado como fungistático, uma vez que muitas hifas se desenvolvem apenas após 60 horas de inoculação.

Como mencionado anteriormente, o tanino é considerado o principal constituinte do extrato do “barbatimão” e os efeitos atribuídos a este princípio para

que este exerça ação antimicrobiana ainda não foram totalmente comprovados, porém hipóteses indicam que este seja capaz de i) inibir a atividade enzimática através de formação de complexos com o substrato presente no agente, ii) atuar diretamente sobre o metabolismo celular com inibição da fosforilação oxidativa e iii) formar complexos com íons metálicos. (HOLETZ et al., 2005).

8) Conclusão

As alterações climáticas decorrentes de fatores como o efeito estufa, têm aumentado a incidência de chuvas e, por conseguinte, o acúmulo de água em regiões de acesso aos animais. Isto acarretou em um aumento na incidência desta doença, que antes já não era pouco relatada.

O diagnóstico precoce pode ser obtido utilizando-se associação de exames, somados ao histórico do paciente. A conscientização de proprietários que criam equinos poderia ser realizada, para que os animais fossem levados ao veterinário quando as lesões estivessem pouco desenvolvidas. A evolução da doença é rápida e em equinos, há ainda um fator complicante, devido a formação de tecido de granulação exuberante.

Partindo-se desta premissa, e dos resultados obtidos, podemos considerar que o ácido tânico foi efetivo na inibição do crescimento de hifas de *Pythium insidiosum*, em concentrações inferiores quando comparadas com os extratos das folhas e casca do barbatimão.

9) Referências Bibliográficas

ALEXOPOULOS, C.J.; MIMS, C.W.; BLACKWELL, M. **Introductory Mycology**. 4ª ed. New York: John Wiley & sons Inc., 1996.

BISSONNETTE, K.W. et al. Nasal and retrobulbar mass in a cat caused by *Pythium insidiosum*. **J Med Vet Mycol** 29:39-44, 1991.

BOSCO, S.M.G. et al. Human pythiosis Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.11, p. 715-717, 2005.

BROWN, T.A., et al. In vitro susceptibility of *Pythium insidiosum* and a *Lagenidium* sp to itraconazole, posaconazole, voriconazole, terbinafine, caspofungin and mefenoxam. **AJVR** 69:1463-1468, 2008.

BUERGELT, C.; POWE, J.; WHITE, T. Abdominal pythiosis in a Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*). **Jour. of Zoo and Wild. Med.**, v. 37(2), p.186–189, 2006.

DYKSTRA, M.J.; SHARP, N.J.H.; OLIVRY, T. A description of cutaneous-subcutaneous pythiosis in fifteen dogs. **Med. Mycol.**, Inglaterra, v. 37, p. 427-433, 1999.

GROOTERS, A.M. Pythiosis, lagenidiosis, and zygomycosis in small animals. **The Vet. Clin. of North America. Small Animal Practice**, Estados Unidos, v. 33, n. 4, p. 695-720, 2003.

GROOTERS, A.M.; GEE, M.K. Development of a nested polymerase chain reaction assay for the detection and identification of *Pythium insidiosum*. **J. Vet. Intern. Med.**, v. 16, p. 147-152, 2002.

HORNER J.D. Nonlinear effects of water deficits on foliar tannin concentration. **Biochem. Syst. Ecol.** 18: 211-213, 1990.

KAUFFMAN, L. Penicilliosis marneffeii and pythiosis: emerging tropical diseases. **Mycop.**, v.143, p.3-7, 1998.

LARSSON, C.E. et al. Pitiose canina – aspectos clínicos e epidemiológicos de caso em São Paulo. In: XV Congresso Brasileiro da ANCLIVEPA, Rio de Janeiro-RJ, 1997.

MARQUES, S.A. et al. *Pythium insidiosum*: relato do primeiro caso de infecção humana no Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, v.81(5), p.483 – 485, 2006.

MAZA, P.K et al. Effects of *Stryphnodendron adstringens* on ultrastructures of promastigote forms of *Leishmania amazonensis*. In: Programs and abstracts nineteenth congress of the Brazilian society for microscopy and microanalysis, 2003. Acta Microscopia, p. 317-318.

MELLO, J.C.P.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavan-3-ols and prodelphinidins from *Stryphnodendron adstringens*. **Phytochemistry** 41: 807-813, 1996.

- MENDOZA, L.; AJELLO, L. Infections caused by the oomycetous pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Mycol. Med.**, v. 6, p. 151-164, 1996.
- MENDOZA, L.; HERNANDEZ, F.; AJELLO, L. Life Cycle of the Human and Animal Oomycete Pathogen *Pythium insidiosum*. **J. Clin. Microbiol.**, v.31(11), p.2967-73, 1993.
- MILLER, R.I. Treatment of equine phycomycosis by immunotherapy and surgery. **Aust Vet J.**, v.57, p.377-82, 1981.
- MILLER, R.I.; CAMPBELL, R.S.F. Immunological studies on equine phycomycosis. **Australian Veterinary Journal**. v. 58, p. 227-231, 1982.
- PAULA, R.C. **Efeito de extratos vegetais sobre atividades biológicas do veneno da serpente *Lachesis muta***. 2009. 77f. Tese (Mestrado) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2009.
- PESAVENTO, P.A. et al. Cutaneous Pythiosis in a Nestling White-faced Ibis. **Vet. Pathol.**, v. 45, p. 538–541, 2008.
- RAKICH, P.M.; GROOTERS, A.M.; TANG K. Gastrointestinal pythiosis in two cats. **J. Vet. Diagn. Invest.**, v. 17, p. 262–269, 2005.
- REIS, J.L. et al. Disseminated pythiosis in three horses. **Vet. Microbiol.**, v. 96, p. 289-295, 2003.
- SANTOS, S.C., et al. Tannin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002.
- SANTOS, S.C. et al. Seasonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16(4): 552-556, Out./Dez. 2006.
- SANTURIO, J.M.; FERREIRO, L. **Pitiose: uma abordagem micológica e terapêutica**. 1ª ed., Porto Alegre: UFRGS editora, 2008. 111p.
- TRISCOTT, J.A.; WEEDON, D; CABANA, E. Human subcutaneous pythiosis. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 20, p. 267-271, 1993.
- WELLEHAN, J.F.X. et al. Pythiosis in a dromedary camel (*Camelus dromedarius*), **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, v.35, p.564-568, 2004.
- VILELA, R et al. Vulvar pythiosis in two captive camels (*Camelus dromedarius*). **Med Mycol**, 22 jun. 2011 (*epub ahead of print*).