

COMPORTAMENTO DE LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA* "IN VITRO" A ANTIFÚNGICOS

Maria do Socorro de Sousa FURTADO¹, Débora da Rocha PIMENTA²,
Jeronilson de Almeida FERREIRA¹, Ana Cláudia CORTÊZ¹

RESUMO — Estudou-se o comportamento de leveduras do gênero *Candida* a antifúngicos, pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) "in vitro" de 30 cepas de *Candida* frente aos antifúngicos: miconazol, cetoconazol e anfotericina B. Empregou-se o método de diluição em meio líquido e os antifúngicos foram diluídos visando proporcionar concentrações a partir de 0,06 a 128 µg/mL. O inóculo foi padronizado ajustando-se a suspensão para conter 1×10^6 ufc/mL. A concentração para a qual houve maior convergência de cepas foi de 1 µg/mL (26,5%) para anfotericina B. Para miconazol foi de 16 µg/mL (26,0%) e para cetoconazol 32 µg/mL (23,0%). Os valores de CFM foram de 2 µg/mL (23,5%) para anfotericina B, de 16 e 64 µg/mL (26,5%) para miconazol e 32 e 64 µg/mL (30,0%) para cetoconazol. Este imidazólico mostrou os valores de CIM e CFM mais elevados atingindo até 128 µg/mL em algumas espécies. As espécies de *Candida* mostraram-se mais sensíveis à Anfotericina B, quando comparadas em relação aos antifúngicos testados. Sobre o desempenho das espécies de *Candida*, melhor padrão de comportamento foi verificado para *C. albicans* com níveis mais baixos de sensibilidade.

Palavras-chave: *Candida*; antifúngicos

Sensitivity of *Candida* Yeasts to Antifungals "In Vitro"

ABSTRACT — The response of *Candida* species to antifungal agents was evaluated by determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) "in vitro". Amphotericin B, miconazole and ketoconazole were tested at concentrations between 0,06 to 128 µg/mL using the broth dilution method. Inocula of 30 *Candida* strains were standardized by adjusting the suspension to contain 1×10^6 cfu/mL. Highest strain convergence was seen at MIC of 1,0 µg/mL for amphotericin B (26,5%), 16 µg/mL for miconazole (26,0%) and 32 µg/mL for ketoconazole (23,0%). MFC values were 2 µg/mL for amphotericin B (23,5%), 16 and 64 µg/mL for miconazole (26,5%) and 32 and 64 µg/mL for ketoconazole (30%). This imidazole showed the highest MIC and MFC with values up to 128 µg/mL. All *Candida* species, were more sensitive to amphotericin B than to the others two drugs, and *C. albicans* was the species with the highest sensitivity.

Key-words: *Candida*, antifungal

INTRODUÇÃO

As leveduras estão entre as infecções mais comuns causadas por fungos. O gênero *Candida* vive saprofiticamente no tubo digestivo do homem e de certos animais, podendo ter ação patogênica em quase todas as partes do organismo humano. As manifestações clínicas da doença são as mais variadas, podendo ser subaguda, aguda ou crônica

O envolvimento pode ser localizado na boca, orofaringe, couro cabeludo, vagina, unhas, brônquios, pulmões, trato gastrointestinal ou generalizado como septicemia, endocardite e meningite (ARENAS, 1993).

Os processos patológicos também são variados indo desde irritação e inflamação até uma resposta granulomatosa e supurativa.

As leveduras do gênero *Candida*, comportam-se como agentes oportunistas.

¹ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Caixa Postal 478, 69011-970, Manaus, Amazonas, Brasil

² Bolsista de Iniciação Científica (PIBIC-INPA)

De acordo com observações realizadas (LACAZ, 1980; MALLIE *et al.*, 1982) sua virulência está condicionada a fatores ligados ao hospedeiro, o qual em condições fisiológicas ou na vigência de entidades mórbidas diversas, ou face à iatrofarmacogenia desenvolve quadros clínicos variados, com lesões superficiais ou profundas.

Nos pacientes idosos, debilitados, recém-nascidos prematuros, e, desnutridos como também em pacientes infectados pelo HIV, LACAZ (1985) faz referência à ocorrência de candidíase, em suas variadas formas clínicas.

Com relação aos fatores locais (LACAZ, 1980; LACAZ *et al.*, 1984) referem como um dos principais, a umidade. Assim, trabalhadores em bares e lavadeiras, estando permanentemente em contato com água, muitas vezes contaminada, e sabões, possibilitam a colonização do fungo, principalmente em sulcos ou dobras cutâneas onde as leveduras encontram melhores condições para seu crescimento. A maceração da pele por fatores mecânicos ou químicos, também favorece o crescimento da levedura, sob a forma filamentosa.

Trabalhos anteriores (MC GINNIS, 1980) têm demonstrado que o gênero *Candida* apesar de seu caráter saprofítico, pode desenvolver grave patogenicidade na ocorrência de uma mudança em seu ambiente natural como por exemplo em decorrência de alterações do pH, aumento de temperatura e umidade entre outros fatores. Quando isto acontece, estabelece-se um desequilíbrio na sua população que passa a desenvolver-se em grande quantidade e devido ao seu caráter oportunista, tornar-se também um

patógeno.

Em observação às citações de IWATA & YAMAGUCHI (1973), FROMTLING & SHADOMY (1983), MINAGAWA *et al.* (1983), GUGLIELMINETTI & CREMA (1984), GERACI (1986), HOEPRICH & MERRY (1986) e ODDS *et al.* (1986), devido ao grande índice de micoses ocasionadas por estas leveduras e com o crescimento do número de portadores de HIV que estão atualmente entre os grupos mais susceptíveis a estas infecções, torna-se necessário o desenvolvimento de testes de sensibilidade para analisar o comportamento das espécies do gênero mediante quimioterápicos para estabelecer o diagnóstico e a terapêutica adequados, visto que na maioria dos casos poderá tornar-se generalizada e resistente aos antifúngicos usuais.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizadas 30 cepas de leveduras isoladas de material biológico humano de pacientes com suspeita clínica de dermatomicose. O material examinado, constou de escamas epidérmicas, fragmentos de unha e secreções (Tab. 1).

Realizou-se Testes de sensibilidade a antifúngicos pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM).

Os agentes antifúngicos empregados nos testes de sensibilidade foram os derivados imidazólicos: cetoconazol (Johnson & Johnson Indústria e Comércio S/A), miconazol (Johnson & Johnson Indústria e Comércio S/A) e o poliênico anfotericina B (Squibb Indústria Química S/A), na forma micropulverizada.

O método utilizado nos experimentos foi o de diluição em meio líquido, sendo

Tabela 1. Origem das leveduras do gênero *Candida*, por localização.

Local	Gênero/Espécie				Total
	<i>C. albicans</i>	<i>C. guilliermondii</i>	<i>C. parapsilopsis</i>	<i>C. stellatoideae</i>	
Unha	13	2	1	1	17
Glande	4	-	1	-	5
Mão	2	-	-	-	2
Axila	2	-	-	-	2
Escarro	1	-	-	-	1
Pé	1	-	-	-	1
Inguinal	1	-	-	-	1
Glúteo	1	-	-	-	1
Total	25	2	2	1	30

C = *Candida*

empregado o meio Yeast Nitrogen Base (DIFCO) pH 6,0. Os antifúngicos foram dissolvidos em 5,0 mL de dimetil sulfoxido (DMSO), para obter soluções contendo 10.000 µg/mL. Essas soluções foram acondicionadas em alíquotas de 1 mL em tubos rosqueáveis e estocadas a 70° C. Para preparar solução de trabalho (1000 µg/mL), o estoque foi diluído (1:100) em meio líquido, conservado a 70° C e usado por um período de até 15 dias. A diluição seriada (1:2) foi padronizada para 12 concentrações diferentes, de 128 µg/mL a 0,06 µg/mL, para obter 5 mL de meio com cada concentração final dos agentes antifúngicos. Para inoculação, utilizou-se cepas recém-cultivadas (48 horas) em meio de Sabouraud Agar.

Uma suspensão foi preparada da porção superficial da cultura em água destilada estéril. Desta suspensão, obteve-se por contagem em hematocítmetro, uma quantidade padrão de células leveduriformes (1×10^6 ufc/mL) que foi usada para inocular 100 µL para cada tubo de ensaio. Estes testes foram incubados a 30° C e interpretados após 48 horas.

Sob condições padronizadas, a CIM foi considerada como a menor concentração que inibiu crescimento fúngico. Leitura positiva nos tubos, foi aquela em que crescimento foi possível de ser observado à vista desarmada. Para a determinação da CFM, os tubos com ausência de crescimento foram reinoculados em tubos de ensaio contendo novo meio sem o agente antifúngico. Esta nova série foi incubada a 30° C e lida após 48 horas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

As 30 cepas de *Candida* testadas com relação ao seu comportamento frente aos derivados imidazólicos cetoconazol, miconazol e o poliênico anfotericina B, mostraram-se sensíveis aos mesmos em graus variáveis, o que se observa pelos valores de CIM e de CFM encontrados. Com relação a anfotericina B, os valores de CIM encontrados foram de 0,12 µg/mL a 4 µg/mL para *C. albicans*; de 0,25 a 2 µg/mL para *C. guilliermondii*, de 0,12 a 2 µg/mL para *C. parapsilopsis* e de 4 µg/mL para *C. stellatoideae*. Os valores

de CFM foram de 0,2 a 64 µg/mL para *C. albicans*, de 1 a 4 µg/mL para *C. guilliermondii*; de 1 a 8 µg/mL para *C. parapsilopsis* e de 64 µg/mL para *C. stellatoideae* (Tab. 2).

Os níveis de CIM encontrados com cetoconazol foram para *C. albicans*,

(26,5%) das cepas na CIM e para a de 2 µg/mL na CFM, correspondendo a 7 (23,5%) das cepas, enquanto que para o cetoconazol maior concentração se situou em 32 µg/mL com 7 (23%) das cepas na CIM e entre as de 32 µg/mL a 64 µg/mL na CFM com 9 (30%)

Tabela 2. Atividade antifúngica de Anfotericina B frente ao gênero *Candida* pela CIM e CFM.

Espécies	Nº Cepas	CIM	CFM
<i>C. albicans</i>	25	0,12 a 4 µg/mL	0,25 a 64 µg/mL
<i>C. guilliermondii</i>	2	0,25 a 2 µg/mL	1 a 4 µg/mL
<i>C. parapsilopsis</i>	2	0,12 a 2 µg/mL	1 a 8 µg/mL
<i>C. stellatoideae</i>	1	4 µg/mL	64 µg/mL

C = *Candida*

de 0,25 a 64 µg/mL; para *C. guilliermondii* de 0,5 a 4 µg/mL; para *C. parapsilopsis* de 2 a 8 µg/mL e para *C. stellatoideae* 1 µg/mL. Os valores de CFM, foram para *C. albicans* de 2 a 128 µg/mL; para *C. guilliermondii* de 8 a 32 µg/mL; para *C. parapsilopsis* de 4 a 32 µg/mL e para *C. stellatoideae* de 8 µg/mL.

Os níveis de CIM encontrados para miconazol foram para *C. albicans* de 0,12 a 32 µg/mL, para *C. guilliermondii* de 8 µg/mL, para *C. parapsilopsis* 4 a 16 µg/mL e para *C. stellatoideae*, de 16 µg/mL (Tab. 4)

Os valores de CFM encontrados foram de 1 a 128 µg/mL para *C. albicans*, de 8 a 16 µg/mL para *C. guilliermondii*, de 16 µg/mL para *C. parapsilopsis* e 16 µg/mL para *C. stellatoideae* (Tab. 6).

Quanto ao grau de convergência para uma determinada concentração, observamos que em relação a anfotericina B, houve maior direcionamento das cepas para a de 1 µg/mL correspondendo a 8

das cepas; para miconazol, houve maior convergência para a concentração de 16 µg/mL com 8 (26,5%) das cepas na CIM e de 16 e 64 µg/mL com 8 (26,5%) das cepas na CFM (Tabs. 3, 5 e 7).

De um modo geral, as cepas de *Candida* examinadas, mostraram-se mais sensíveis ao poliênico anfotericina

Tabela 3. Níveis de sensibilidade (CIM e CFM %) de *Candida* para Anfotericina B.

Concentrações (µg/mL)	Total de cepas	
	CIM %	CFM %
0,06	-	-
0,12	6 (20,0%)	-
0,25	4 (13,5%)	2 (6,5%)
0,5	1 (3,5%)	1 (3,5%)
1	8 (26,5%)	3 (10,0%)
2	6 (20,0%)	7 (23,5%)
4	5 (16,5%)	3 (10,0%)
8	-	5 (16,5%)
16	-	2 (6,5%)
32	-	2 (6,5%)
64	-	5 (16,5%)
128	-	-
Total	30 (100%)	30 (100%)

Tabela 4. Atividade antifúngica do Cetoconazol frente ao gênero *Candida* pela CIM e CFM.

Espécies	CIM	CFM
<i>C. albicans</i>	0,25 a 64 µg/mL	2 a 128 µg/mL
<i>C. guilliermondii</i>	0,5 a 4 µg/mL	8, a 32 µg/mL
<i>C. parapsilopsis</i>	2 a 8 µg/mL	4 a 32 µg/mL
<i>C. stellatoideae</i>	1 µg/mL	8 µg/mL
C = <i>Candida</i>		

Tabela 5. Níveis de sensibilidade (CIM e CFM %) de *Candida* para Cetoconazol.

Concentrações (µg/mL)	Total de cepas	
	CIM %	CFM %
0,06	-	-
0,12	-	-
0,25	1 (3,5%)	-
0,5	4 (13,5%)	-
1	2 (6,5%)	-
2	4 (13,5%)	1 (3,5%)
4	3 (10,0%)	2 (6,5%)
8	3 (10,0%)	1 (3,5%)
16	1 (3,5%)	2 (6,5%)
32	7 (23,0%)	9 (30,0%)
64	5 (16,5%)	9 (30,0%)
128	-	3 (10,0%)
Total	30 (100%)	30 (100%)

B tanto com relação a CIM quanto com a CFM o que se constata pelo maior número de cepas localizadas em baixas concentrações (Tab. 3).

Entre os dois imidazólicos testados, o miconazol foi o antifúngico para o qual as cepas mostraram melhor desempenho com níveis mais baixos de sensibilidade, enquanto que para o cetoconazol, os níveis de sensibilidade foram um pouco mais elevados (Tabs. 5 e 7).

Apesar de neste estudo termos testado 25 cepas de *C. albicans* contra 5 cepas de *Candida* não *albicans*, comparando-se o desempenho das espécies de *Candida* com relação aos antifúngicos, verificamos melhor padrão de comportamento de *C.*

albicans com níveis mais baixos de sensibilidade; entretanto estes resultados não são conclusivos e não válidos como referencial para as diversas espécies de *Candida*. Os níveis de sensibilidade encontrados, são demonstrados pela CIM (Tabs. 2, 4 e 6).

Tabela 6. Atividade antifúngica do Miconazol frente ao gênero *Candida* pela CIM e CFM.

Espécies	CIM	CFM
<i>C. albicans</i>	0,12 a 32 µg/mL	1 a 128 µg/mL
<i>C. guilliermondii</i>	8 µg/mL	8, a 16 µg/mL
<i>C. parapsilopsis</i>	4 a 16 µg/mL	16 µg/mL
<i>C. stellatoideae</i>	16 µg/mL	16 µg/mL
C = <i>Candida</i>		

Tabela 7. Níveis de sensibilidade (CIM e CFM %) de *Candida* para Miconazol.

Concentrações (µg/mL)	Total de cepas	
	CIM %	CFM %
0,06	-	-
0,12	1 (3,5%)	-
0,25	-	-
0,5	2 (6,5%)	-
1	-	1 (3,5%)
2	5 (16,5%)	-
4	4 (13,5%)	2 (6,5%)
8	4 (13,5%)	4 (13,5%)
16	8 (26,5%)	8 (26,5%)
32	6 (20,0%)	6 (20,0%)
64	-	8 (26,5%)
128	-	1 (3,5%)
Total	30 (100%)	30 (100%)

Bibliografia Citada

- ARENAS, R. 1993. *Micologia Médica Ilustrada*. Ed. Interamericana. Mc Grow Hill, México. 397 p.
- FROMTLING, R. A.; YU, H. P.; SHADOMY, S. 1983. In vitro inhibitory activities of 2 new orally absorbable imidazole derivatives: Bay 7133 and Bay 1 9139. *Sabouraudia*, 21: 179-184
- GERACI, P. 1986. Miconazole in the tropical treatments vulvovaginitis caused by

- Candida albicans*. Gazz. Med. Italarch Sci. Med., 145 (3): 129-132
- GUGLIELMINETTI, M.; CREMA, F. 1984. Sensibilità dei lieviti e dei funghi filamentosi gli antifungini. Studio comparativo in vitro. *Farmaco Edizione Pratica*, 39(5): 139- 47
- HOEPRICH, P. D.; MERRY, J. M. 1986. Influence of culture medium on susceptibility testing with Bay 7133 and Ketoconazole. *J. Clin. Microbiol.*, 24(2): 269-71
- IWATA, K.; IAMAGUCHI, T. 1973. Mode of action of Clotrimazole. *Sabouraudia*, 11: 58-65
- LACAZ, C. S. 1980. *Candidiases*. Ed. Pedagógica e Universitária Ltda., São Paulo, 190 p.
- 1985. *AIDS, Doutrinas, Aspectos Iatrosfilosóficos e Infecções Oportunistas Associadas*. Sarvier, S. Paulo, 124 p
-; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C., 1984. *Micologia Médica*, 8ª ed, S. Paulo, Sarvier, 479 p.
- MALLIE, M.; JOUVERT, S.; LEBECQ, J. C. ; BASTIDE, J. M. 1982. Valeur comparee de diferents methodes d'evaluation de la C.M.I. des antifongiques: sensibilité de *Candida albicans* a l'econazole. *Société Française de Mycologia Medicale*, 155- 60
- MINAGAWA, H.; KITAURA, K.; NAKAMIZO, N. 1983. Effects of pH on the activity of Ketoconazole against *Candida albicans*. *Antimicrobiol. Agents and Chemother.*, 23(1): 107-07
- Mc GINNIS, M.R. 1980. *Laboratory handbook of Medical Micology*. New York Academic Press, 411-31
- ODDS, F. C.; ABOIT, A. B.; PYE, G.; TROKE, P. F. 1986. Improved method for estimation of azole antifungal inhibitory concentrations against *Candida* species, based on azole antibiotic interactions. *J. Med. and Veter. Mycol.*, 24: 305- 311

Aceito para publicação em 18.06.97