



**PERFIL DE SENSIBILIDADE A DROGAS ANTIMICROBIANAS DE FUNGOS ISOLADOS
NOS LABORATÓRIOS DIDÁTICOS DO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS (UFAM)**

Lorena Isabela Teixeira Muniz
Universidade Federal do Amazonas
lorenaisabelamuniz@gmail.com

Sônia Maria da Silva Carvalho
Universidade Federal do Amazonas
Soniacarvalho973@gmail.com

RESUMO

Os testes de sensibilidade a antifúngicos são indicados para fungos patogênicos, muito úteis à comunidade médica quanto ao tipo de tratamento medicamentoso que deva ser adotado, além de fomentar o desenvolvimento de novos produtos para a indústria farmacêutica. Dessa forma, este estudo teve como objetivo realizar testes de sensibilidade a antimicrobianos em fungos coletados nos laboratórios didáticos da UFAM e auxiliar na identificação de possíveis tratamentos contra patogenias causadas por esses microrganismos. Primeiramente, realizou-se a reativação dos fungos, a fim de efetuar a contagem das colônias e descrevê-las morfológicamente. Foi verificada a sensibilidade dos fungos *Aspergillus sp.*, *Gliocladium sp.* e *Penicilium sp.* aos antimicrobianos fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e anfotericina B por meio de testes de difusão em meio de cultura (Sabouraud Dextrose Ágar, Ágar-Czapek e Ágar-Batata-Dextrose). Avaliou-se a eficiência dos antimicrobianos a partir da formação de colônias, indicando se houve ou não resistência do patógeno. Aferiu-se que o Cetoconazol demonstrou menor eficácia, sendo que Itraconazol e Fluconazol apresentaram efeito fungistático em todas as concentrações. Houve resistência dos microrganismos a Anfotericina B, enquanto a frequência de sensibilidade foi alta para o Miconazol em todas as concentrações, exceto para os microrganismos *Aspergillus sp.*, *Gliocladium sp.* e *Penicilium sp.*

Palavras-Chave: sensibilidade; resistência; terapêutica.



1. INTRODUÇÃO

Fungos são organismos eucarióticos que podem ser encontrados no meio ambiente e até mesmo na flora saprófita humana. Algumas infecções causadas por fungos podem não ser graves, mas outras são agravantes, como é o caso das infecções invasivas e, além disso há possibilidade de ocorrer complicações na resposta terapêutica ao antifúngico administrado (FONSECA, 2014; DIMITRIOS e LEWIS, 2002).

Segundo o Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI, 2003), os antifúngicos pertencentes ao grupo Azóis (cetoconazol, fluconazol, itraconazol e miconazol) agem pela inibição da 14- α -esterol desmetilase, uma CYP microsossomal. A Anfotericina B é um polieno que se liga ao ergosterol alterando a permeabilidade e o equilíbrio da membrana, levando a perda de proteínas e cátions resultando na desestabilização do potencial da membrana e morte fúngica. É amplamente usado em infecções fúngicas invasivas, ainda que com restrições devido a efeitos adversos e uso por via endovenosa (FONSECA, 2014; MARTINEZ, 2006; BRUNTON, CHABNER e KNOLLMANN, 2012).

O fungo *Penicillium* sp. é caracterizado por infecções adquiridas a partir da inalação; é e comumente relacionado a infecções pulmonares, queratites, otomicoses e endoftalmites. (MARTINS, MELO E HEINS, 2005). Segundo Mezzari e Fuentefria (2012), o tratamento para o *Penicillium* sp. faz uso de cetoconazol, itraconazol e, sendo o mesmo resistente ao fluconazol e moderadamente sensível a anfotericina B.

O gênero *Aspergillus* sp., é caracterizado como oportunista por manifestar-se especialmente em indivíduos imunodeprimidos. É considerado como patógeno causador da aspergilose além de quadros infecciosos, enfermidades disseminadas, endocardites e infecções pulmonares (ANVISA, 2004). As espécies *A. fumigatus* e *A. flavus* são os principais responsáveis por causar a aspergilose; o tratamento está associado ao uso de antifúngicos azólicos (DENARDI et al., 2018).

A pesquisa teve como objetivo testar o perfil de sensibilidade dos fungos coletados nos laboratórios didáticos do ICB-UFAM, sendo eles: *Aspergillus* sp., *Gliocladium* sp. e *Penicilium* sp. Os testes foram realizados a partir da exposição dos mesmos a concentrações diferentes dos agentes antimicrobianos: fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e anfotericina B. Assim sendo, por meio do estudo de perfil de sensibilidade destes fungos, este projeto contribuirá antecipando, o possível tratamento de patogenias que possam acometer àqueles que frequentam os laboratórios didáticos do ICB da UFAM, cujos fungos estejam presentes no ambientes.

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a sensibilidade dos fungos coletados nos laboratórios de pesquisa do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas quando expostos a fármacos antimicrobianos.

3. METODOLOGIA

Os Fungos reativados para o Fungiograma foram: *Aspergillus* sp., *Gliocladium* sp. e *Penicilium* sp. . Estes foram inoculados em concentração de 5×10^3 na superfície das placas de Petri contendo os meios de cultura: Sabouraud Dextrose Ágar, ÁgarBatata-Dextrose ou Ágar-Czapek, de acordo com o gênero, espalhando o material com uma alça de drigalski; ficou em repouso por 15 minutos.

Aplicação em ágar dos discos impregnados com antimicrobianos: Foram usados os antimicrobianos: fluconazol, itraconazol, cetoconazol, miconazol e anfotericina B, para determinar a sensibilidade fúngica. Os fármacos foram aplicados sobre os discos em concentrações de 50 em 50 mg, até atingir o limite de dose usual de cada um. Sendo as concentrações: Cetoconazol 200mg, 150mg, 100mg e 50mg; Miconazol 5 mg, 10mg, 15mg e 20 mg; Itraconazol 50mg e 100mg, Anfotericina B 0,3 mg; Fluconazol 50mg, 100mg e 150mg. Os discos ficaram em contato total com o meio na placa e distribuídos igualmente sobre este com distância máxima de 24mm entre seus centros. Após a aplicação dos discos as placas foram armazenadas a 26°C até 15 minutos.



Isolamento das amostras fúngicas por repique: Os fungos preservados pela técnica de água destilada estéril, Castellani (1939), foram inoculados na superfície de placas de Petri com os meios de cultura: Sabouraud Dextrose Ágar e Ágar-Czapek, de acordo com o meio adequado para cada fungo; e ficaram incubados por um período de 15 a 30 dias, a 25°C, para o crescimento.

Preparo de lâminas para confirmação da Micromorfologia: A lâmina foi preparada com fragmentos fúngicos retirados das colônias, colocados sobre lâminas com corante Azul de Lactofenol e trituradas para melhor visualização; a esse material foi sobreposto lamínula, para observar no microscópio.

Incorporação do antimicrobiano ao meio de cultura: Cetoconazol, Fluconazol e Itraconazol são fármacos na forma sólida, e foram triturados cadinho, dissolvidos em água Milli-Q, em eppendorf estéril. Após diluição, filtrados por um sistema de filtração de seringa estéril -MCE 0,45 µg, a fim de se obter um líquido homogêneo. Os antimicrobianos Miconazol e Anfotericina B foram incorporados diretamente no meio de cultura, sem a necessidade de filtrá-los.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Analisando as respostas de sensibilidade obtidas para os azólicos (cetoconazol, itraconazol, fluconazol e miconazol) para o gênero *Aspergillus sp* de maneira geral, esperava-se que o fungo apresentasse maior sensibilidade para o tratamento de infecções por este gênero, como descrito por Denardi (2018). Os melhores resultados foram observados somente para o miconazol, enquanto o cetoconazol e o itraconazol mostraram-se ineficientes para tratar *Aspergillus sp*. Vale ressaltar que o fluconazol e o cetoconazol, em suas maiores concentrações, e o miconazol, em todas as concentrações testadas, apresentaram ação fungistática para *A.niger*, nos testes de incorporação. Apenas o miconazol se mostrou eficiente para *Aspergillus e Gliocladium*. A resistência intrínseca do *Aspergillus sp*. já era esperada para o Itraconazol (Zaitz et. al., 2010).

A Anfotericina B mesmo usado em infecções fúngicas invasivas, é possível que o resultado demonstrado para este, tenha sido afetado por ser um medicamento em loção, o que dificulta sua incorporação ao disco. Mezzari e Fuentefrias (2012) afirmam que o cetoconazol e o itraconazol são eficazes para o tratamento de patologias por *Penicillium sp.*, ao contrário da resistência apresentada para o fluconazol. Diferente do que a literatura apresenta, os testes realizados mostraram que este apresenta pouca resistência para o Miconazol, que possui ação fungistática sobre o fungo.

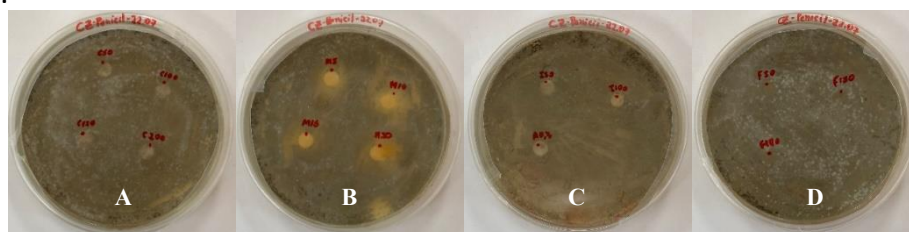


Figura 1 – *Penicillium sp.* em teste de disco-difusão com as concentrações: (A) Cetoconazol 50 mg, 100 mg, 150 mg e 200 mg; (B) Miconazol 5 mg, 10 mg, 15 mg e 20 mg; (C) Itraconazol 50 mg, 100 mg e Anfotericina B 250 mg; (D) Fluconazol 50 mg, 100 mg, 150 mg.

É possível afirmar que em todos os testes houve resistência a Anfotericina B (Figura 3) para todos os gêneros desta pesquisa, validando os dados na literatura quanto ao uso deste antimicrobiano em casos de infecções fúngicas invasivas, alertando não somente para o uso da Anfotericina B em específico, mas para o aumento da resistência fúngica devido ao uso generalizado de alguns antifúngicos tornando-se um agravante para determinar tratamentos medicamentosos para patologias de natureza fúngica (LACAZ, 2002; MARTINS et al., 2005; MARTINEZ, 2006; BRUTON et al., 2012; MEZZARI e FUENTEFRÍAS, 2012; SIDRIM e ROCHA, 2012).

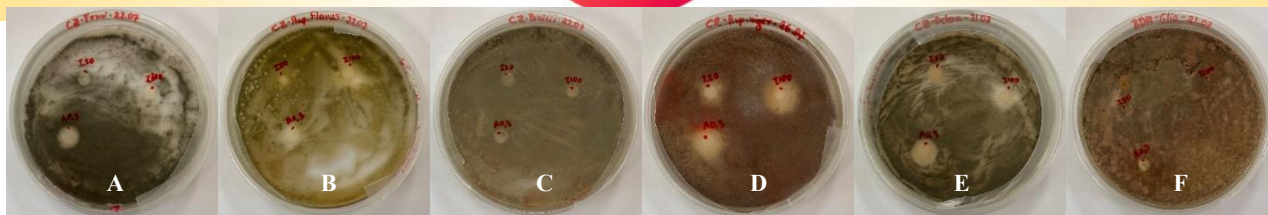


Figura 2 – *Aspergillus fumigatus* (A), *Aspergillus flavus* (B), *Penicillium* sp. (C), *Aspergillus niger* (D), *Aspergillus ochraceus* (E) e *Gliocladium* sp. (F) em teste de disco-difusão com as concentrações: Itraconazol 50 mg, 100 mg e Anfotericina B 250 mg.

5. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos pelos testes de sensibilidade pode-se concluir que as drogas antifúngicas que demonstraram menor eficácia foram o Cetoconazol, Itraconazol e Fluconazol, e a frequência de sensibilidade foi alta para o Miconazol e a Anfotericina B que se mostraram resistentes. A frequência de resistência foi alta para a Anfotericina B, sendo recorrente sua ação fungistática nas colônias, evidenciando a necessidade da realização de pesquisas a fim constatar a resistência a uma nova dosagem da droga, visto que ocorreu uma certa resistência para a dosagem mínima recomendada. As técnicas utilizadas nesta pesquisa demonstraram ser excelentes ferramentas para a auxiliar na determinação de tratamentos medicamentosos para patologias ocasionadas por fungos, sendo ambas consideradas de fácil aplicação e de interpretação dos resultados obtidos, cumprindo a finalidade de expor a eficácia ou não eficácia do medicamento testado. Recomenda-se, apenas, o uso de discos prontos comercializados a fim de evitar quaisquer problemas referentes à concentração dos fármacos.

REFERÊNCIAS

- ARENDROP, M. C.; MELETIADIS, C.; MOUTON, J. W.; LAGROU, K.; PETR HAMAL, GUINEA, J. and the Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). **Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para fungos filamentosos formadores de conídios.** EUCAST – Documento Definitivo E.DEF. 9.3.1 – Janeiro 2017 . Traduzido em: março de 2020 por Dra. Analy Salles de Azevedo Melo e Dra. Kelly Ishida.
- BRUNTON, L.L.; CHABNER, B.A.; KNOLLMANN, B.C. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goldman & Gilman.** 12 Ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.
- CUENCA-ESTRELLA, M.; VERWEIJ, P. E.; ARENDROP, M. C.; ARIKAN-AKDAGLI, S.; BILLE J.; DONNELLY J. P.; et al. **ESCMID* guideline for the diagnosis and management of Candida diseases 2012: diagnostic procedures.** Clin Microbiol Infect. 2012;18:9-18.
- DIMITRIOS K., LEWIS R. **Antifungal drug resistance of pathogenic fungi.** The Lancet. 2002;359(9312):1135-44.
- FONSECA, M. R. **A importância dos testes de suscetibilidade aos antifúngicos.** Universidade da Beira Interior. Ciências da Saúde. Covilhã, junho de 2014.
- LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia médica.** 9 ed. São Paulo: Sarvier, 2002.
- MARTINEZ, R. **Atualização no uso de agentes antifúngicos.** Jornal Brasileiro de Pneumologia. São Paulo, v. 32, n. 5, 2006.
- MARTINS, J. E. C.; MELO, N. T.; HEINS-VACCARI, E. M. **Atlas de Micologia Médica.** 1 ed. Baruer SP: Manole, 2005.
- MEZZARI, A.; et al. **Os fungos anemófilos e sensibilização em indivíduos atópicos em Porto Alegre, RS.** Rev. Assoc. Med. Bras. 49 (3). 2003.
- SIDRIM, J.J.C.; ROCHA, M.F.G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** 1 Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a minha orientadora Professora Sônia Maria da Silva Carvalho quem me deu oportunidade de realizar o projeto, a Universidade Federal do Amazonas pelo apoio.