

Determinação da Concentração Inibitória Mínima do Clotrimazol e da Terbinafina sobre isolados de *Candida albicans* oriundas da mucosa bucal de pacientes HIV positivos e HIV negativos

André Luis Ribeiro CLAUDINO¹

Cristiane Sbruzi GRANJA²

Adriene Ribeiro LIMA³

Claudete Rodrigues PAULA⁴

Natanael Atilas ALEVA⁵

Renata Beatriz SILVA⁶

Jorge Kleber CHAVASCO⁷

^{1,2 e 3} Biólogos pela UNIFAL-MG (Universidade Federal de Alfenas).

⁴ Farmacêutica e Professora Titular da USP (Universidade de São Paulo).

⁵ Cirurgião Dentista e Professor de Graduação e Pós Graduação do INAPÓS (Pouso Alegre-MG).

⁶ Farmacêutica Bioquímica, Mestre em Ciências – Patologia Geral, Doutoranda em Ciências – Patologia Clínica, Professora Substituta do Curso de Biomedicina da UFTM (Universidade Federal do Triângulo Mineiro).

⁷ Farmacêutico Bioquímico, Professor Associado da UNIFAL-MG.

Autor correspondente: Jorge Kleber Chavasco- Universidade Federal de Alfenas, Rua Gabriel Monteiro da Silva 700, Alfenas-MG- 37130-000, Telefone: 35-3299-1305. E-mail: jkchavasco@uol.com.br

Resumo: A candidíase é uma infecção fúngica causada por leveduras do gênero *Candida* que vivem nas mucosas e só causam doença quando existem condições que favoreçam o seu crescimento, como nos pacientes imunodeprimidos infectados pelo vírus HIV. Os relatos de resistência verificados em isolados de *Candida albicans*, principalmente em pacientes imunocomprometidos, e a necessidade de um tratamento rápido e eficaz fazem com que haja um grande interesse em estudos que sejam capazes de utilizar testes de susceptibilidade “in vitro” para a escolha da terapia adequada. O objetivo deste trabalho foi de determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos antifúngicos clotrimazol e terbinafina sobre 19 isolados de *Candida albicans*, oriundas de pacientes HIV positivos e HIV negativos com candidose oral eritematosa para detectar possível resistência. Utilizou-se a técnica de diluição de antifúngicos em agar e posterior inoculação das amostras em regiões demarcadas na placa de Petri. Verificou-se que a CIM para a terbinafina variou de 32 a 128 µg/mL enquanto que, para o clotrimazol, a CIM variou de 16 a 128 µg/mL. Este estudo nos permitiu concluir que a maioria das cepas de *C. albicans* isoladas apresentou valores de CIM elevados indicando resistência e estes não variaram de um antifúngico para outro, bem como não houve diferenças das CIM entre as amostras de pacientes HIV positivos e HIV negativos.

Palavras-chave: candidíase bucal. terbinafina. clotrimazol. *C. albicans* . HIV

Determination of Clotrimazole and Terbinafine Minimum Inhibitory Concentration on *Candida albicans* isolates from HIV-positive and HIV-negative patients oral mucosa

Abstract: Candidiasis is a fungi infection caused by yeasts from *Candida* genus, that live in the mucosas and just causes illness when there are favoring conditions to its growth, like immune compromised HIV infected patients. Resistance reports verified in *Candida albicans* isolates, especially in those immune compromised, and fast and efficient treatment need cause there to be a great interest in studies capable of using *in vitro* susceptibility tests to adequate therapy choose. The objective of this study was to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of antifungal agents clotrimazole and terbinafine on 19 isolates of *Candida albicans* isolated from HIV positive patients

and HIV-negative with oral erythematous candidiasis to detect possible resistance. Using agar antifungal dilution thecnic and sample at demarcated regions on Petri dish. It was verified that MIC to terbinafine varied from 32 to 128 µg/mL while to clotrimazole, MIC varied from 16 to 128 µg/mL. This study allowed concluding that almost samples showed elevated MIC values among HIV positive or negative patients.

Keywords: oral candidiasis. terbinafine. clotrimazole. *C. albicans*.HIV

INTRODUÇÃO

A candidíase ou candidose é uma infecção fúngica produzida pela levedura *Candida albicans*, que vive nas mucosas e causa doença quando existem condições que favoreçam o seu crescimento. É a mais comum das infecções fúngicas que afetam a boca; podem desenvolver-se em qualquer superfície da mucosa e em pacientes infectados pelo HIV, que normalmente, apresentam a lesão no palato duro e palato mole (AIDS, 2003).

No primeiro caso de doença notificado que, posteriormente, foi diagnosticado como AIDS, a candidíase foi descrita como uma das características da doença em 4 de cada 5 pacientes. É também encontrada nos aspectos clínicos de quase todos os pacientes que participam dos antigos grupos de risco: hemofílicos, pacientes que são submetidos a transfusões sanguíneas ou usuários de drogas. A forma bucal pode ser o primeiro sinal ou sintoma de infecção pelo HIV. Observam-se 3 formas clínicas predominantes em pessoas HIV positivo: Eritematosa, Pseudomembranosa e Queilite Angular (AIDS, 2003).

Geralmente, o tratamento é efetivo, pelo menos nos casos em que o paciente não se encontra nos estágios finais de infecção pelo HIV, sendo fundamental a identificação e eliminação do fator predisponente. O maior problema é que são infecções crônicas que requerem tratamentos contínuos. A terapêutica exige o uso de antifúngicos tópicos e sistêmicos e a incorporação de bochechos com substâncias alcalinas. A Nistatina aplicada topicamente, o Cetoconazol de uso sistêmico ou a Anfotericina B são medicamentos utilizados, bem como o Fluconazol, em casos de resistência. Uma boa higienização bucal é importante para o sucesso do tratamento .

Um dos primeiros medicamentos eficazes no tratamento de candidíase foi a nistatina. Esta droga, entretanto, apresenta toxicidade quando usada por via intravenosa e não é absorvida pelo trato gastrointestinal. Em função disso, novas pesquisas continuaram a ser feitas, propondo o uso de Anfotericina B, que apesar de alta eficácia é também dotada de alta toxicidade (MEDOFF, 1980; MEYER, 1994; WALSH, 1994). Outras drogas antifúngicas como a 5-fluorocitosina e derivados azólicos com reduzido efeito tóxico

surgiram no mercado mais recentemente (TEREEL; HUGHES, 1992).

A candidíase de orofaringe, normalmente, diagnosticada em mais de 75% dos pacientes com AIDS, durante o decorrer da enfermidade, além de recidivar em alta frequência leva a um desconforto durante a mastigação dos alimentos. Estes fatores acarretam diminuição do estado imunológico e faz-se necessário o tratamento eficaz e de maneira rápida. (KERRIDGE; NICHOLAS, 1986; IWATAK, 1992; DUPONT, 1994; COLOMBO, 1994). O uso freqüente de terapia antifúngica em pacientes com AIDS, visto as constantes recidivas de candidíase bucal ou esofágicas, é fator que provavelmente influencia na ocorrência de resistência a diferentes drogas .

O grande número de drogas antifúngicas, o relato de resistência verificado em isolados de *Candida*, principalmente em pacientes imunocomprometidos, e a necessidade de um tratamento rápido e eficaz fazem com que haja um grande interesse em estudos que sejam capazes de padronizar testes de susceptibilidade *in vitro* para a escolha da terapia adequada (MERZ, 1986; KORTING *et al.*, 1988; SHADOMY; PFALLER, 1991; ALVES e CURY, 1992; GALGIANI *et al.*, 1992; COLOMBO, 1994; NCCLS, 1997).

Os métodos utilizados na execução dos testes de suscetibilidade para fungos geralmente são adaptações daqueles

empregados para bactérias. As técnicas disponíveis baseiam-se na diluição em caldo, diluição em ágar e difusão em ágar. Os dois primeiros testes, avaliam a concentração inibitória mínima (CIM) da droga capaz de inibir o crescimento do fungo, ou ainda a concentração fungicida mínima (CFM) que é a menor concentração da droga capaz de matar o fungo .

No entanto, os testes de sensibilidade a drogas *in vitro*, não têm sido empregados rotineiramente, embora eles forneçam informações valiosas quanto à pesquisa de novas substâncias, resistência aos antifúngicos de uso freqüente, controle terapêutico de infecções e caracterização de amostras fúngicas (MERZ, 1986; KORTING *et al.*, 1988; SHAMADOMY; PFALLER, 1991).

Além disso, fatores como solubilidade, estabilidade química e modo de ação da droga, composição e pH dos meios de cultura, tempo e temperatura de inoculação, concentração do inóculo e a definição do ponto de inibição (McGINNIS, 1980; PFALLER *et al.* 1988; SHADOMY; PFALLER, 1991; GALGIANI *et al.*, 1992) são os principais interferentes na reprodutibilidade dos testes de sensibilidade aos antifúngicos, além da falta de utilização de um único método por diversos autores, para que seus resultados possam ser comparáveis (LACAZ; PORTO; MARTINS, 1991; GALGIANI *et al.*, 1992).

Dentre os antifúngicos utilizados, o Clotrimazol (Figura 1) apresenta amplo espectro de ação, inibindo a biossíntese do ergosterol e de outros esteróides, danificando e alterando a permeabilidade da membrana celular do fungo, resultando na perda de elementos intracelulares essenciais. Seu mecanismo de ação envolve também a inibição da biossíntese dos triglicérides e fosfolípídeos fúngicos, da atividade enzimática oxidativa e peroxidativa, resultando em aumento intracelular de concentrações tóxicas de peróxido de hidrogênio que contribuem para a deterioração de organelas subcelulares e necrose celular.

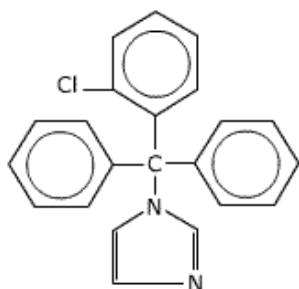


Figura 1 – Fórmula estrutural do Clotrimazol.

Já a Terbinafina (Figura 2) é um antifúngico sintético inibidor não competitivo da escavene epoxidase, enzima necessária para a biossíntese do ergosterol.

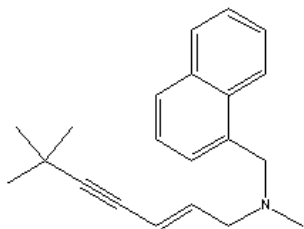


Figura 2 – Fórmula estrutural da Terbinafina.

Diante da necessidade de ampliação o conhecimento sobre a ação dos antifúngicos empregados na terapêutica da candidíase oral, o presente estudo teve como objetivo avaliar a eficiência dos antifúngicos Terbinafina e Clotrimazol em culturas isoladas de *Candida albicans*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os isolados de *C. albicans* foram obtidos de 52 pacientes da clínica odontológica da Universidade de São Paulo (USP) com sintomas de candidíase bucal eritematosa, mediante assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido. O presente trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UNINCOR. Os antifúngicos utilizados nestes experimentos correspondem a produto de alta pureza fornecido pelos respectivos fabricantes. A técnica utilizada foi a da diluição em agar utilizada por ALVES e CURY (1992). A composição dos meios de cultura e soluções está descritas nos anexos.

Foi utilizado meio agar tampão fosfato. O agar foi fundido na água fervente e a seguir acrescentados os sais. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave.

Como meios de reserva foram utilizados caldo e agar *Yeast Nitrogen Base Phosphate* (YNBP). Os componentes sólidos foram misturados em tampão levemente aquecido e

posteriormente o meio foi esterilizado por filtração e conservado a 4°C.

Os componentes foram misturados em condições assépticas e distribuídos em alíquotas de 7 mL em tubos estéreis e estocados a 4°C até o momento do uso.

O meio foi preparado no momento do uso. O meio de reserva foi misturado, sob condições assépticas, ao agar tampão fosfato fundido e resfriado a 45°C. Foram distribuídos volumes de 18 mL em tubos estéreis e mantidos em banho – maria.

Ao tampão levemente aquecido foi adicionado tween 80 e volumes de 4 mL foram distribuídos em tubos, e a seguir esterilizados em autoclave a 121 °C por 15 minutos.

Para o preparo das soluções estoques de antifúngicos, foram pesados 25,6 mg de cada antifúngico e dissolvidos em 1 mL de dimetil sulfóxido. Após o preparo da solução em tubo estéril, a mesma foi deixada em repouso por 10 minutos para auto esterilização e posteriormente realizado as diluições no caldo YNBP.

Para a diluição das drogas e dos meios, foi preparada uma série de 10 tubos, sendo que o primeiro tubo continha 19 mL de caldo YNBP e os demais, 7 mL de caldo YNBP. Ao primeiro tubo foi adicionado 1 mL da solução estoque do antifúngico e feita homogeneização. A partir deste tubo, foram realizadas diluições seriadas ao dobro, até alcançarmos o tubo numero 10. De cada tubo

da série com as diluições da droga, foi transferido 2 mL para outros 10 tubos contendo cada um, 18 mL de agar YNBP mantidos a 45°C.

Após homogeneização o meio com a droga incorporada foi vertido em placas de Petri estéreis. Após solidificação, estas foram conservadas em geladeira por no máximo uma semana. As concentrações finais das drogas variaram entre 0,25 µg/mL a 128 µg/mL.

Na obtenção dos inóculos, a partir dos cultivos de 48 horas a 25°C em agar Sabouraud dextrose das amostras de *C. albicans*, foram feitas suspensões em 5 mL de tampão fosfato com Tween 80. O inóculo foi padronizado por fotometria em espectrofotômetro com absorvância entre 0,05 a 0,08 em 530 nm equivalente a aproximadamente 10⁶ UFC / mL (PFALLER *et al.*, 1988; SHADOMY e PFALLER, 1991; GALGIANI *et al.*, 1992).

As suspensões padronizadas de *C. albicans* foram inoculadas num volume de 10µL nas placas contendo antifúngico num total de 20 amostras por placa. Após a secagem natural do inóculo as placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. A leitura foi realizada anotando a presença ou ausência de crescimento da levedura e foi considerada a concentração inibitória mínima, a menor concentração da droga que impediu o crescimento.

RESULTADOS

Das 52 amostras coletadas isolou-se 19 amostras de *C. albicans*. As amostras de números 4 a 30 correspondem a pacientes HIV negativos e de 33 a 52 a pacientes HIV positivos. Verificou-se que a CIM para a terbinafina variou de 32 a 128 µg/mL e quanto ao clotrimazol a CIM variou de 16 a 128 µg/mL. Os resultados encontram-se no quadro 1 e representam a media de três experimentos.

DISCUSSÃO

Infecções por *Candida albicans* só causam doença em condições que favoráveis e o seu desenvolvimento pode ocorrer em qualquer superfície mucosa. Neste trabalho foram realizados testes para a avaliação da CIM frente a amostras isoladas de *Candida albicans*. As amostras foram obtidas de pacientes HIV positivos e HIV negativos com candidíase bucal eritematosa.

A maioria das amostras apresentou CIM elevadas aos antifúngicos Terbinafina e Clotrimazol, ou seja, valores superiores 128 µg/mL. Considerando que os níveis plasmáticos da Terbinafina alcançam valores de 0,97µg/mL com doses orais de 250 mg.

Tabela 01 – Determinação da concentração inibitória mínima de antifúngicos sobre amostras de *C. albicans* isoladas de pacientes HIV positivos e pacientes HIV negativos com candidíase eritematosa.

Número da Amostra	Numero de Referência no ICB/USP	Concentração Inibitória Mínima (CIM) (µg/mL)	
		Terbinafina	Clotrimazol

4	13P	>128,0	>128,0
13	35P	64,0	>128,0
16	22P	32,0	>128,0
19	29P	>128,0	>128,0
21	17P	>128,0	>128,0
23	27P	>128,0	64,0
24	34P	>128,0	64,0
25	24P	>128,0	64,0
27	25P	>128,0	>128,0
29	44P	>128,0	>128,0
30	11P	>128,0	64,0
33	6H	>128,0	>128,0
37	26H	>128,0	>128,0
41	02H	>128,0	>128,0
42	21LH	>128,0	>128,0
46	9H	64,0	16,0
48	3H	>128,0	>128,0
51	25H	>128,0	>128,0
52	11H	>128,0	>128,0

podem-se classificar como resistente as amostras que apresentaram CIM superiores a este valor.

Quintero *et al.* (1986) comprovaram *in vivo* a eficácia do Clotrimazol em doses de 500 mg. Eles demonstraram que nesta concentração o Clotrimazol é tão eficaz quanto o Miconazol de 1200 mg.

Belkis Fernandes (1998) comparou a eficácia *in vivo* de Clotrimazol e Terbinafina em pacientes afetados com outra espécie de fungo, o *Tinea pedis*. Eles demonstraram que a terbinafina é capaz de produzir resposta eficaz mais rápida em período mais curto de tempo.

Marcano (1995) comparou a eficácia do Clotrimazol com Fluconazol a 150mg *in vivo*. A erradicação micótica foi verificada em 61,5

% dos pacientes tratados com Clotrimazol e 64,0% dos pacientes tratados com Fluconazol.

Mena Cedilos *et al.*, (1998) compararam a eficácia e a tolerância de Terbinafina (em creme) em candidíase das nádegas em lactantes. Os resultados demonstraram diferenças significativas e se considera a Terbinafina como alternativa em uma circunstância clínica.

Outro estudo comparativo foi realizado por Herrera *et al.* (1988, p.138-143). Eles compararam a eficácia nitrato de Butoconazol com o Clotrimazol. Os resultados demonstraram que a eficácia é muito similar em ambos os produtos na cura microbiológica, mas em testes clínicos e Terbinafina com valores de CIM muito mais baixos que o Clotrimazol. Mas quando estudados especialmente fungos leveduriformes, como a *Candida albicans*, a eficácia da Terbinafina é questionada tanto *in vivo* quanto *in vitro* (BELKYS FERNANDEZ, 1998).

REFERÊNCIAS

1. AIDS – Manifestações Oraís. **Infecções fúngicas**. Disponível em: <<http://www.odontogeral.hpg.ig.com.br/aids/manifstbucais.html>>. Acesso em: 19 maio 2003.
2. ALVES, S.H.; CURY, A. E. Sensibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de pacientes com câncer, à antifúngicos poliênicos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v.34, p. 251-254, 1992.

terapêuticos o Butoconazol se mostrou mais eficiente.

Entre estudos sobre tratamento de vulvovaginite por *Cândida*, Itaiá *et al.*, (1985) compararam a eficiência do Clotrimazol e o Miconazol no tratamento desta doença. Eles selecionaram 80 pacientes e a porcentagem de pacientes curados com Clotrimazol foi de 80,0% no primeiro teste e 90,0% no segundo. Já o Miconazol apresentou 67,5% e 77,5% de eficácia, respectivamente.

De acordo com os dados do presente estudo, o Clotrimazol apresentou um resultado muito semelhante à Terbinafina contrariando alguns autores que citam a

CONCLUSÃO

Os resultados dos experimentos permitem concluir que os valores de CIM da Terbinafina e Clotrimazol foram muito semelhantes, com CIM maiores que 128 µg/mL para a maioria das amostras.

3. BELKYS FERNANDEZ, Torres. Influência do tempo de incubação na determinação da atividade antifúngica "in vitro" do terbinafina frente a *Trichophyton rubrum*. **Iberoamericana de Micologia**, v.15, p.290-293, 1998.
4. COLOMBO, A. L. **Avaliação *in vitro*, por três métodos diferentes da sensibilidade de leveduras a antifúngicos azólicos**.1994. 72 p. Tese (Doutorado). Escola Paulista de Medicina, São Paulo,1994.

5. CURY, A . E.; MICHE, M.P. Atividade de derivados imidazólicos contra espécies de *Candida* isoladas de pacientes com câncer. **Rev. Microbiol.**, v.20, p.249-53, 1989.
6. CURY, A . E. ;MICHE, M. P. ; MINAMI, P.S., Leveduras isoladas de pacientes com câncer: incidência e sensibilidade à antibióticos. **Rev Microbiol.**, v.20, p.102-7, 1989.
7. DUPONT, B. *et al.* Mycosis in AIDS patients. **J. Med. Vet.Mycol.**, v.32, p.65-77, 1994.
8. GALGIANI, J.N. *et al.* Standartization of antifungal susceptibility testing. **J.Med. Vet. Mycol.** v.30, p.213-224,1992. Supl.1.
9. HERRERA NAVA, Enrique. *et al.* Nitrato de butoconazole em candidiase vulvovaginal: estudo comparativo com clotrimazol. **Ginecol. Obstet. Mex**, v.56 p.138-143, maio 1988.
10. ITAIA, J. H.*et al.* Estudo comparativo com clotrimazol e miconazol e em tratamento local de candidiase vulvovaginal. **Obstet. Ginecol Latinoam**, v.43, n.3/4, p.108-112, mar./abr. 1985.
11. IWATA,K. Drug resistance in human pathogenic fungi. **Eur. J. Epidemiol.**, v.8, p.407-421, 1992.
12. KERRIDGE, D.; NICHOLAS, R. O. Drug resistance in the opportunist pathogens *Candida albicans* and *Candida glabrata*.. **J. Antimicrob. Chemother.** , v.18, p.39-49, 1986. Supl.B.
13. KORTING, H.C.*et al.* “In vitro” susceptibilities and biotypes of *Candida albicans* isolates from oral cavities of patients infected with human immunodeficiency virus. **J. Clin. Microbiol.**,v.26, p.2626-2631, 1988.
14. LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica**. 8.ed. São Paulo: Sarvier, 1991. P.695.
15. MARCANO, Carmen *et al.* Eficácia e segurança de fluconazol a doses de 150mg. Comparadas com clotrimazol no tratamento de pacientes com tinea cruris e pedis. **Arch. Venez. Farmacol. Ter.** v.14, n.1, p.35-38, 1995.
16. MCGINNIS, M.R. **Laboratory handbook of medical mycology**. New York: Academic Press, 1980. p.661.
17. MEDOFF, G.; KOBAYASHI, G.A. The polyenes . In: Speller,D. (Ed.) **Atifungal chemotherapy**. New York: John Willey, 1980. p.3-33.
18. MENA CEDILOS, Carlos Alfredo. Estudo comparativo entre terbinafina em creme contra detoconazol em creme, eficácia e tolerância no tratamento de candidiase na zona del panal em lactantes. **Bol. Méd. Hosp. Infant. Méx.**, v.55, n.10, p.563-568, out. 1998.
19. MERZ, W.G. Susceptibility testing of medically important fungi. **Adv. Exp. Med. Biol.** v.202, p.127-134, 1986.
20. MEYER, R.D. Treatment of fungal infections in patients with HIV-infection or AIDS. **Zbl.Bakt**, v.281, p.1-7, 1994.
21. NCCLS (National Cmmittee for Clinical Laboratorry Standards) Reference method for broth dilution antifungal suscepytibility testing fou yeast: approved standard. **Document** v.17-A , p.1-29,1997.
22. PFALLER, M.A. *et al.* Multicenter evaluation of four methods of yeast inoculum preparation. **J.Clin. Microbiol.** , v.26, p.1437-1441, 1988.
23. QUINTERO, CARLOS; SEINAUI, JORGE. Comparação da eficácia e tolerância de clotrimazol. **Rev. Colomb. Obstet. Ginecol.**, v.37, n.5, p.376-384, 1986.
24. SHADOMY, S.; PFALLER , M.A . Laboratory studies with antifungal agents:susceptibility tests quantitation in body fluids and bioassays. In : **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: Americam Society for Microbiology, 1991, p.1173-1183.

25. TERREL, C.L.; HUGHES, C.E.
Antifungal agents used for deep- seated
mycotic infections. **Mayo Clin.Proc.** , v.67,
p.69-91, 1992.
26. WALSH, T. J. et al. Recent advances in
epidemiology, prevention and treatment of
invasive fungal infections in neutropenic
patients. **J. Med. Vet. Mycol.**, v.32, p.33-51,
1994.