



PERFIL DE SUSCETIBILIDADE DE *CANDIDA ALBICANS* A FORMULAÇÃO ORAL MAGISTRAL DE NISTATINA

BETTA, Adriana Della.¹

RECTOR, Bianca.²

ROSSATTO, Simone Terezinha.³

ZANNIN, Giovane Douglas⁴

Resumo

A candidíase é a mais frequente infecção fúngica oportunista, a qual apresenta um amplo espectro de ação, que vai desde as manifestações banais, como a colonização de mucosas (oral, vaginal e esôfago), até quadros sistêmicos, com a invasão de vários órgãos. Espécies de *Cândida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis. Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas. Grandes quantidades de drogas antifúngicas podem ser utilizadas no tratamento das candidíases cutâneo-mucosas, dentre as classes mais comumente utilizadas encontram-se os polienos (anfotericina B e nistatina) e os azóis (cetoconazol, fluconazol e itraconazol). Os polienos formam complexos com o ergosterol produzindo poros na membrana plasmática, levando ao aumento da permeabilidade da membrana, liberando o conteúdo intracelular conduzindo à morte celular. Nas candidíases da cavidade oral, aconselha-se usar a nistatina como droga de escolha, várias vezes ao dia, na forma de bochechos, ou mantendo-a por alguns minutos na boca. Assim, a presente pesquisa apresentou um comparativo de três formulações de suspensão oral de nistatina usadas para tratamento de infecção por fungo, através da metodologia de Kirby-Bauer (discos difusão) para avaliar a suscetibilidade desses medicamentos manipulados.

¹ Acadêmica 9º período Graduação em Farmácia – Centro Universitário Assis Gurgacz. E-mail: adrianadbeta@gmail.com

² Acadêmica 9º período Graduação em Farmácia - Centro Universitário Assis Gurgacz. E-mail: biaa_rector@hotmail.com

³ Acadêmica 9º período Graduação em Farmácia – Centro Universitário Assis Gurgacz E-mail: simone_rossatto@yahoo.com

⁴ Mestre em Ciência Farmacêutica – Professor do Centro Universitário Assis Gurgacz. E-mail:



PALAVRAS-CHAVE: Candidíase, Antifúngico, Magistral.

SUMMARY

Candidiasis is the most frequent opportunistic fungal infection, which presents a broad spectrum of action, ranging from banal manifestations such as colonization of mucous membranes (oral, vaginal and esophagus), to systemic conditions, with the invasion of various organs. *Candida* species reside as diners, being part of the normal microbiota of healthy individuals. However, when there is a rupture in the normal microbiota balance or the host immune system is compromised, species of the genus *Candida* tend to aggressive manifestations, becoming pathogenic. Large amounts of antifungal drugs can be used to treat cutaneous mucosal candidiasis. Among the most commonly used classes are polyenes (amphotericin B and nystatin) and azole (ketoconazole, fluconazole and itraconazole). Polyenes form complexes with ergosterol producing pores in the plasma membrane, leading to increased membrane permeability, releasing intracellular contents leading to cell death. In the candidiasis of the oral cavity, it is advisable to use nystatin as a drug of choice, several times a day, in the form of mouthwash, or keeping it for a few minutes in the mouth. Thus, the present study presented a comparison of three formulations of oral nystatin suspension used for the treatment of fungal infection using the Kirby-Bauer methodology (diffusion disks) to evaluate the susceptibility of these manipulated drugs.

KEY WORDS: Candidiasis, Antifungal, Magistral.

1. INTRODUÇÃO

Infecções fúngicas sistêmicas (IFS) são de difícil diagnóstico e estão associadas à elevada mortalidade e morbidade, constituindo um sério problema de saúde pública. A incidência de (IFSs) tem aumentado nas últimas duas décadas. Entre os fungos oportunistas, os mais importantes continuam sendo *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, no entanto outras espécies, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis* e *Trichosporon spp.*, começam a despontar (Menezes et al., 2009; Arendrup 2010; Gomes et al., 2010; Menezes et al., 2011; Vasconcelos et al., 2011; Menezes et al., 2012).



Candidemias são infecções na corrente sanguínea causadas por *Candida* spp. A principal espécie responsável por candidemias na América Latina é *C. albicans*, no entanto *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* estão se tornando cada vez mais frequentes e, em alguns casos, superam *C. albicans* (Nucci et al., 2010).

Os agentes antifúngicos são classificados de acordo com o tipo de ação que exercem sobre as células dos fungos. Entre as classes mais comumente utilizadas encontram-se os polienos (anfotericina B e nistatina) e os azóis (cetoconazol, fluconazol e itraconazol) (SHEPPARD & LAMPIRIS, 2008). Os polienos formam complexos com o ergosterol produzindo poros na membrana plasmática, levando ao aumento da permeabilidade da membrana, liberando o conteúdo intracelular conduzindo à morte celular. São classificados como fungicidas e possuem largo espectro de ação (RANG et al., 2004).

Bem como todas as populações de microrganismos, as leveduras são organismos adaptáveis a condições de estresse. Quando uma pressão seletiva é imposta, seja a exposição a um antifúngico, estas desencadeiam mecanismos de modo a superar o estresse causado. O desenvolvimento de resistência antifúngica deriva da seleção de isolados com alterações genéticas que codificam para a resistência (ANDERSON, 2005). A obtenção de resistência antifúngica destina-se a neutralizar os efeitos fungicidas ou fungistáticos das diferentes classes de antifúngicos, o que é conseguido através da redução da acumulação do fármaco no interior da célula fúngica, diminuição da afinidade do antifúngico à proteína alvo e alteração no metabolismo (VANDEPUTTE, FERRARI e COSTE, 2012). A aquisição de resistência aos polienos é rara, pois este antifúngico possui baixa solubilidade e elevada toxicidade no hospedeiro, o que limita a sua utilização na terapia antifúngica em longo prazo. Os mecanismos de resistência desta classe ainda não estão estudados/descritos pela comunidade científica, mas admitem-se várias hipóteses como: alteração dos esteróis da membrana celular, defesa contra danos oxidativos, mutações nos genes envolvidos na biossíntese do ergosterol, como o gene *ERG3* e *ERG6*, e alteração do rácio fosfolípido dos esteróis (PEREA & PATTERSON, 2002).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEORICA

2.1 FUNGOS

Fungos são seres aclorofilados, que não tem capacidade de produzir energia ou material plástico por meio da energia da luz e do gás carbônico (CO₂), ou seja, não realizam fotossíntese, porque não possuem cloroplasto. São seres heterotróficos quimiotróficos, dependendo das substâncias previamente formadas. São eucariotas, podendo ser haplóides, diplóides ou poliploides, apresentando uma parede rígida quitinosa. Os fungos reproduzem-se de forma vegetativa, sexual, assexual e parassexual. (MINAMI, 2003).

Esses seres estão dispersos pelo meio ambiente, no ar atmosférico, em vegetais, no solo, na água. São estimados em 250 mil espécies, mas menos de 150 foram descritos como patogênicos aos seres humanos. As leveduras são fungos com capacidade de colonizar o homem e os animais, e quando perde o equilíbrio parasita-hospedeiro, podem causar diferentes quadros infecciosos com formas clínicas localizadas ou disseminadas (LEVY, 2004).

2.2 CANDIDÍASE

A candidíase é uma infecção causada pelo fungo *Cândida*. Espécies de *Cândida* residem como comensais, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis. Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas. Quanto à origem, pode ser endógena, quando oriunda da microbiota, ou exógena, como uma DST (NAGLIK JR, CHALLACOMBE J, HUBE, 2003; MONGE RA, ROMÁN E, NOMBELA C, PLA J. 2006).

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância, pela alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro humano, sendo encontradas no tubo gastrointestinal em 80% da população adulta saudável. Entre as mulheres, cerca de 20 a 30% apresentam colonização por *cândida* vaginal, e em hospitais, o gênero *cândida* responde por cerca de 80% das infecções fúngicas documentadas, representando um grande desafio aos clínicos de diferentes especialidades devido às

dificuldades diagnósticas e terapêuticas das infecções causadas por tais agentes. Infecções por *Candida* envolvem um espectro amplo de doenças superficiais e invasivas oportunistas, acometendo pacientes expostos a uma grande diversidade de fatores de risco. Infecções de pele e mucosas podem ser documentadas em pacientes saudáveis, mas com pequenas alterações locais de resposta do hospedeiro no sítio da infecção. Por outro lado, infecções sistêmicas por *Candida* podem comprometer vísceras como resultado de disseminação hematogênica, complicações infecciosas estas geralmente documentadas em pacientes críticos, portadores de doenças degenerativas e/ ou neoplásicas (COLOMBO AL, GIMARÃES T, 2003).

2.3 TRANSMISSÃO

A transmissão da candidíase ocorre por meio de contato com mucosas e secreções em pele de portadores ou doentes, contato sexual, água contaminada, transmissão vertical durante o parto normal (BRASIL, 2010).

A relação sexual não é considerada a principal forma de transmissão, pois *Candida* spp. pode fazer parte da flora endógena em até 50% das mulheres assintomáticas (BRASIL, 2006).

2.4 ESPÉCIES DO GÊNERO CANDIDA

Nos últimos anos, vem aumentando o número de espécies de *Candida*. Em 1963, eram conhecidas apenas cinco espécies de *Candida* como causadoras de doenças em humanos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. stellatoidea* (*C. albicans* var. *stellatoidea*) e *C. guilliermondii*. Em 2003, Colombo e Guimarães relataram que até aquele momento eram conhecidas cerca de 17 espécies de *Candida* (gênero com quase 200 espécies conhecidas). As principais espécies de interesse clínico são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*. As espécies do gênero *Candida*, segundo a taxonomia, localizam-se em: Reino Fungi, Filo Ascomycota, Classe Saccharomycetes, Ordem Saccharomycetales, Família Saccharomycetaceae (ZIARRUSTA GB, 2002).

2.5 *CANDIDA ALBICANS*

C. albicans é a espécie mais frequentemente isolada de infecções superficiais e invasivas em diversos sítios anatômicos e como causa de candidíase em todas as partes do mundo. É a espécie de cândida com maior conhecimento patogênico, devido à diversidade de fatores de virulência descobertos. Habitualmente se considera que a origem de *C. albicans* causadora de infecções seja a microbiota do trato digestório humano (organismo comensal), porém diversos casos têm sido relatados de forma horizontal. *C. albicans* foi o primeiro fungo zoopatogênico que teve o seu genoma sequenciado (organismo diploide com oito pares de cromossomos), o que possibilita uma variedade de experimentos e, por conseguinte, um grande avanço na biologia deste fungo, principalmente na expressão dos genes (MAGEE BB, MAGEE PT. 2005; TIRASCHI IN, CARNOVALE S, BENETUCCI A, FERNÁNDEZ N, KURLAT I. 2007).

2.6 MORFOLOGIA

O fungo *C.albicans* é um fungo conhecido por sua forma leveduriforme (Blastoconídeos) no estado saprofítico, onde está associado com a colonização assintomática, ou em formas filamentosas (pseudo-hifas e hifas verdadeiras) observadas em processos de colonizações patológicas, em condições subótimas, nesse fungo pode acontecer formação de clamidósporos (esporos arredondados que possuem uma espessa parede celular). Dessa maneira, o fungo adquire uma capacidade de se adaptar a diferentes nichos biológicos podendo ser então considerado, rigorosamente, um organismo “pleomórfico”. (ALVARES et al., 2014).

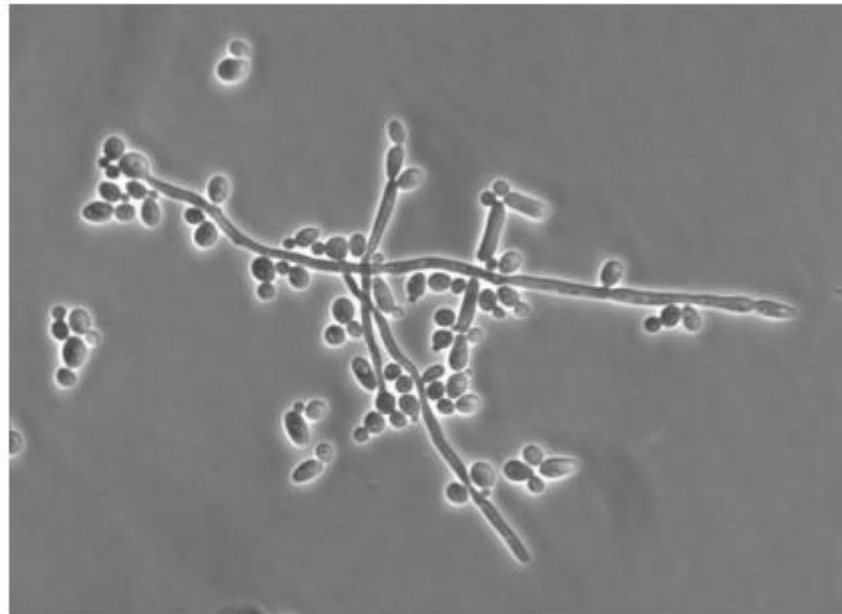


FIGURA 1 – Microscopia da *Candida albicans* fonte: Google imagens.

2.7 MANIFESTAÇÃO CLÍNICA

As manifestações clínicas na candidíase apresentam grande diversidade de quadros, como candidíase cutâneo-mucosa e candidíase invasiva ou sistêmica. A candidíase cutâneo-mucosa consiste em manifestações superficiais, apresentando as seguintes formas: candidíase intertriginosa, onicomicose, candidíase oral, vulvovaginite, balanopostite e candidíase cutâneo-mucosa crônica. Já a candidíase invasiva ou sistêmica caracteriza-se por apresentar infecções profundas ou invasivas, podendo localizar-se em um órgão ou disseminar-se via sanguínea (candidemia). Apresentam-se como quadros de sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, renal, ocular, do sistema nervoso central, ou disseminada, que é uma forma clínica de difícil tratamento (DIGNANI MC, SOLOMKIN JS, ANAISSIE EJ.,2009)

As infecções invasivas estão associadas a internações prolongadas, com elevada taxa de mortalidade e aumento no custo hospitalar. Nesses casos, a melhora ou até a sobrevivência do paciente depende da rápida identificação do patógeno e, conseqüentemente, da introdução precoce da terapia antifúngica (PFALLER MA, DIEKEMA DJ.,2007).

A queda da imunidade celular costuma estar associada a infecções mais graves, enquanto a disseminação hematogênica pode ocorrer a partir de anormalidades anatômicas como o uso de próteses valvares e cateteres (VAZQUEZ, 2003).

2.8 ANTIFUNGICOS

O diagnóstico e tratamento precoce contribuem com o prognóstico do paciente. Algumas patologias apresentam maior incidência no Brasil pela presença de habitat natural do fungo e outros fatores de predisposição relacionados ao hospedeiro como a distribuição relacionada à região geográfica e ao nível socioeconômico, a ocupação profissional, os hábitos e os costumes individuais. O conhecimento dos mecanismos de ação dos antifúngicos é determinante para a escolha correta do melhor tratamento (CLINICAL KNOWLEDGE SUMMARIES, 2009; PERÓN; TEIXEIRA; SVIDZINSKI, 2005; LUPI; TYRING; MCGINNIS, 2005).

O Ministério da Saúde em 2010, sugeria como tratamento os seguintes medicamentos: isoconazol (nitrato), como segunda escolha, tioconazol. Outras substâncias também são eficazes: Clotrimazol, Miconazol, Terconazol, Nistatina, fluconazol, anfotericina B e voriconazol. Destaca-se que a escolha do antifúngico deve estar baseada nos aspectos epidemiológicos da instituição, tendo em vista que, as espécies de candida já apresentam um certo grau de resistência.

Já Goodman & Gilman 2012, adverte uma terapia atualizada em razão da resistência cada vez maior do fungo. Sendo ela, utiliza-se por via tópica: butoconazol, clotrimazol, miconazol, nistatina, tioconazol e terconazol, e por via oral fluconazol.

2.9 NISTATINA

2.9.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS

A nistatina é um antifúngico extraído de culturas de *Streptomyces noursei*, que foi descoberta em 1950 por Hazen e Brown, pesquisadoras dos Laboratórios de Pesquisas do Departamento de Saúde do Estado de Nova Iorque, EUA (TAVARES, 2001; GROESCHKE *et al.*, 2006; HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006a; HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006b). Tem sido empregada na terapêutica

por mais de 50 anos, porém seu uso recente está associado ao aumento do número de casos de candidíases em pacientes com neoplasias, AIDS e outras desordens sistêmicas (CASIGLIA & WOO, 2000; DOROCKA-BOBKOWSKA *et al.*, 2003; GROESCHKE *et al.*, 2006; SHIP *et al.*, 2007).

A nistatina é praticamente insolúvel em água, etanol e clorofórmio, sendo solúvel apenas em dimetilformamida (MARTINDALE, 1999; TAVARES, 2001; TALLURY *et al.*, 2007). Pertence ao grupo dos polienos, e se apresenta como um pó higroscópico, de coloração amarela a marrom claro e de odor que se assemelha a cereais (MARTINDALE, 1999; GROESCHKE *et al.*, 2006). O pH da suspensão aquosa a 3% (p/v) está entre 6,0 e 8,0 (MARTINDALE, 1999; USP 30, 2007). Soluções e suspensões aquosas de nistatina começam a perder a atividade após a preparação, ou seja, calor, luz e presença de oxigênio aceleram a sua decomposição. Logo, o acondicionamento da nistatina deve ser em recipiente hermeticamente fechado, protegido da luz e a uma temperatura em torno de 2 a 8 °C (MARTINDALE, 1999; GROESCHKE *et al.*, 2006). Após a abertura do recipiente, deve ser armazenada no máximo a 25°C e consumida no prazo de até 7 dias (GROESCHKE *et al.*, 2006).

2.9.2 MECANISMO DE AÇÃO

A nistatina é estruturalmente semelhante à anfotericina B, outro antifúngico polieno, e ambos possuem o mesmo mecanismo de ação. É efetiva contra a maioria das infecções causadas pelas espécies de *Candida* spp., porém na prática médica é empregada apenas na profilaxia e tratamento de candidíases superficiais de pele e mucosas (PATTON *et al.*, 2001; TAVARES, 2001; GILMAN *et al.*, 2003; CROY & KNOW, 2004; KATZUNG, 2006; SHIP *et al.*, 2007), além de demonstrar atividades contra *Aspergillus*, *Cryptococcus* e outros fungos (CROY & KNOW, 2004; OFFNER *et al.*, 2004).

A ação antifúngica da nistatina ocorre através da sua interação com ergosterol, esterol presente na membrana plasmática das células fúngicas, o que provoca uma desorganização funcional, devido à formação de canais transmembranas (TAVARES, 2001; HAC-WYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006a; SILVA *et al.*, 2006). Por esses canais ocorre a saída de água e íons essenciais para a sobrevivência

celular, como potássio, amônio, magnésio, fosfato, além da perda de açúcares, ésteres de fosfato e nucleotídeos. Essas alterações levam à perda da permeabilidade seletiva das células fúngicas, que culmina em danos celulares, e posteriormente, na morte celular (TAVARES, 2001; DOROCKA-BOBKOWSKA *et al.*, 2003; CROY & KNOW, 2004; GROESCHKE *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006).

De acordo com suas características farmacológicas, a nistatina é empregada para uso tópico, mesmo quando usada por via oral, desejando um efeito superficial na mucosa oral e digestiva (EPSTEIN & POLSKY, 1998; FARAH *et al.*, 2000; TAVARES, 2001; KATZUNG, 2006; SHIP *et al.*, 2006). No entanto, a apresentação de nistatina na forma lipossômica apresenta menores efeitos adversos, podendo ser administrada por via parenteral (PAUW, 2000; GILMAN *et al.*, 2003; OFFNER *et al.*, 2004; HAWYDRO & DYNAROWICZ-LATKA, 2006a).

Os efeitos adversos da nistatina, quando usada na forma tópica, são incomuns, podendo ocorrer episódios de náuseas, vômitos e diarreias. As reações alérgicas também são raras (TAVARES, 2001; AKPAN & MORGAN, 2002; GILMAN *et al.*, 2003). Muitas vezes, as náuseas são relacionadas ao sabor extremamente desagradável da nistatina, o que pode limitar o uso pelo paciente, diminuindo a adesão ao tratamento (AKPAN & MORGAN, 2002; GILMAN *et al.*, 2003; NEVILLE *et al.*, 2004; MIMS & PARKER, 2006).

2.9.3 APRESENTAÇÃO FORMA FARMACÊUTICA DA NISTATINA

Várias formas de apresentações farmacêuticas de nistatina são encontradas no mercado, destinadas à administração cutânea, vaginal ou oral. As infecções ungueais e as lesões cutâneas hiperqueratinizadas ou crostosas não respondem a esse fármaco (GILMAN *et al.*, 2003; KATZUNG, 2006).

A nistatina para o tratamento da candidíase cutânea é encontrada em preparações farmacêuticas como pomadas, loções, cremes e pós, contendo 100.000 UI do fármaco por cada grama de medicamento (TAVARES, 2001; EVANS & GRAY, 2003; GILMAN *et al.*, 2003). Na forma de pó é preferível o uso para lesões úmidas e deve ser aplicada 2 a 3 vezes ao dia, e pode estar associada a outros fármacos, como



antibióticos e corticosteróides. Nas formas de creme, pomadas e loções, a nistatina deve ser administrada 2 vezes ao dia (GILMAN *et al.*, 2003).

No tratamento da candidíase oral, orofaríngea e esofagiana, a nistatina se apresenta na forma de suspensão oral (TAVARES, 2001; GILMAN *et al.*, 2003). A suspensão contém 100.000 UI de nistatina em cada mL, e deve ser administrada 3 a 4 vezes ao dia, bochechar o medicamento por alguns minutos e seguido de sua deglutição (TAVARES, 2001; GILMAN *et al.*, 2003). Se o paciente não for corretamente instruído, pode expelir o medicamento, devido ao sabor amargo e não tratar a mucosa infectada. Nesses casos, o sabor da nistatina pode ser disfarçado com sacarose. No entanto, esse excipiente pode provocar o desenvolvimento de cáries, principalmente as relacionadas à hipossalivação (EPSTEIN & POLSKY, 1998; AKPAN & MORGAN, 2002; GILMAN *et al.*, 2003; NEVILLE *et al.*, 2004).

2.10 PRODUTOS MANIPULADOS

Historicamente, a manipulação é uma parte integrante da prática farmacêutica que, de acordo com a Lei nº 5991/73, o conceito de farmácia é: Estabelecimento de manipulação de fórmulas magistrais e oficinais, de comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, compreendendo o de dispensação e o atendimento privativo de unidade hospitalar ou de qualquer outro equivalente de assistência médica.

A farmácia sempre exerceu, em todos os tempos, como ainda exerce, uma importantíssima função social, mormente, no Brasil, onde, nos velhos tempos, foi um centro de irradiação cultural de destacada importância (JUNIOR, 1992).

Atualmente a farmácia de manipulação é organizada pela RDC nº 67/2007 que Dispõe sobre Boas Práticas de Manipulação de Preparações Magistrais e Oficinais para Uso Humano em farmácias onde está descrito desde o controle de qualidade até a determinação de validade. Esta resolução deve ser seguida fielmente na farmácia para que durante a vistoria receba a liberação da VISA local. Além de garantir a qualidade, segurança e eficácia dos medicamentos manipulados, sendo que é um mercado muito amplo a ser explorado.

3 MATERIAIS E METODOS

Na análise de suscetibilidade “in vitro”, foi utilizado à cepa controle de *Candida albicans* ATCC 14053 (*American Type Culture Collection*), disponibilizada por um laboratório de referência, para avaliar a sensibilidade da solução oral de nistatina adquiridas em três (3) diferentes farmácias de manipulação da cidade de Cascavel-Paraná. Realizou-se uma revisão bibliográfica através da seleção de artigos acadêmicos disponíveis em sites como Google acadêmico, Scielo, Pubmed, Medline, além de livros para complementar a pesquisa.

A avaliação da atividade da suspensão de nistatina prescrita em 100.000 UI/ml, usando o cultivo de *Candida albicans* ATCC 14053 (Figura 2), foi preparado uma *solução padrão* de nistatina em pó adquirida em farmácia de manipulação para usar como valor de padrão de referência, baseado na metodologia de Ensaio microbiológico de antibióticos da Farmacopeia Brasileira (2010).



Figura 2: cepa repicada em cromo agar de *Candida albicans* ATCC 14053, cedidas pelo laboratório de referência.

Foi usado o meio de cultura ágar Sabouraud preparado a partir do pó desidratado. Diluindo o ágar conforme instrução do rótulo do fabricante e autoclavado por 45 minutos em temperatura de 120 °C, conforme preconiza Farmacopéia Brasileira no preparo de meios de cultura. Após o meio ágar atingir uma temperatura próxima a 50°C, foi distribuído em placas de Petri de 10cm de diâmetro, numa quantidade de 20mL, de maneira que cada placa apresente uma profundidade de aproximadamente



6mm de espessura. Deixado as placas sobre uma superfície plana para solidificação do ágar.

Através do método de Kirby-Bauer (discos difusão), recortou-se o papel filtro em forma de discos com uma espessura de 6 mm, esterilizando, para em seguida impregnar com a solução manipulada de nistatina na quantidade de 25µL, conforme adaptado da metodologia do autor Farias et. al (2003).

Conforme o protocolo da NCCLS (Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests), para a suspensão da cepa controle da *C. albicans*, foi inoculado em um tubo de ensaio, colônias da cândida com 3 ml de salina a 0,9%, comparando-se a turbidez com uma escala padrão de McFarland 0,5. Com auxílio de um swab de algodão estéril, embebedou no líquido e pressionado o swab contra as paredes do tubo para eliminar o excesso. Em seguida realizou a semeadura do inóculo cobrindo toda a extensão da placa do ágar. Girar a placa em 60° e fez-se novas estrias, repetindo a operação três vezes até distribuição homogênea do inóculo.

Com auxílio de uma pinça estéril, colocou-se os discos impregnados com as soluções de nistatinas na superfície do ágar inoculado, fazendo se uma leve pressão sobre eles, para assegurar sua aderência completa ao meio de cultura. Em paralelo, fazer o controle de qualidade em outra placa de Petri (10 cm de diâmetro), preparada com o mesmo lote de meio de cultura e submeter aos mesmos procedimentos, deixando um placa com ágar livre de inóculo para controle negativo e outra placa com repique da cepa de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae* para controle positivo, além de colocar um discos de papel filtro estéril livre de antifúngicos, para avaliar a viabilidade e o crescimento das amostras de fungos.

Incubaram-se as placas semeadas em uma temperatura de aproximadamente 35°C durante o período de 24h à 48h, dependendo do crescimento das colônias, de modo que seja adequado para a leitura dos halos. O perfil de sensibilidade de cada amostra teste foi avaliado em função do diâmetro (mm) do halo produzido ao redor do disco contendo os antifúngicos.

Para padronizar as amostras adquiridas em farmácia magistrais utilizou-se o fungo *Saccharomyces cerevisiae* para avaliar a suscetibilidade do medicamento. Foi submetido às mesmas condições das amostras inoculadas *Candida albicans*. O perfil

de sensibilidade de cada amostra teste foi avaliado e comparado em função do diâmetro (mm) do halo produzido ao redor do disco contendo os antifúngicos e halos formados em inóculo de *Candida* com nistatina. Medindo os halos formados com o auxílio de uma régua milimetrada, sendo registrados os dados. Realizou-se o experimento em duplicata para avaliar a susceptibilidade das três formulações de antifúngicos. Essa metodologia segue fundamentos da Farmacopéia Brasileira 5ª edição volume 1.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Neste estudo, através de técnica de difusão em ágar por disco, adaptada da metodologia realizada por Farias et. al, 2003, na qual verificou se a atividade antimicrobiana de três fármacos (Nistatina 100.000UI) obtidos em farmácias magistrais comparando com padrão preparado conforme descrito na Farmacopéia Brasileira.

A metodologia utilizada nesse estudo para avaliação antimicrobiana foi a de mensuração de halos de inibição que embora apresente limitações, constitui-se de forma economicamente viável e reproduzível, bem como amplamente utilizado (CARSON et al, 2005. PEREIRA et al, 2005)

Os dados da tabela 1 mostram a comparação de halos de inibição de nistatina perante cepas de *Candida albicans* ATCC 14053, onde se observou que amostra Nis F obteve resultado semelhante à amostra padrão, sendo também demonstrado no gráfico 1 perante a curva padrão.

Fármacos/concentração	100.000 UI	80.000 UI	40.000 UI	20.000 UI	10.000 UI
Nis F	30 mm	29 mm	26 mm	25 mm	24 mm
Nis FC	24 mm	23 mm	22 mm	20 mm	19 mm
Nis T	16 mm	15 mm	14 mm	12 mm	11 mm
Padrão	30 mm	28 mm	25 mm	22 mm	20 mm

Tabela 1: Valores de diâmetro (mm) de halos de inibição de fármacos analisados.

Já a amostra Nis T apresentou valores de halos de inibição menores quando comparadas a amostra padrão não atingindo valores esperados. Dessa forma a suspensão da amostra Nis T demonstrou uma ação antifúngica inferior em comparação com os demais resultados frente à cepa de *Candida albicans*. A amostra Nis NF também apresentou um halo de inibição inferior à amostra padrão, conforme representado no gráfico abaixo:

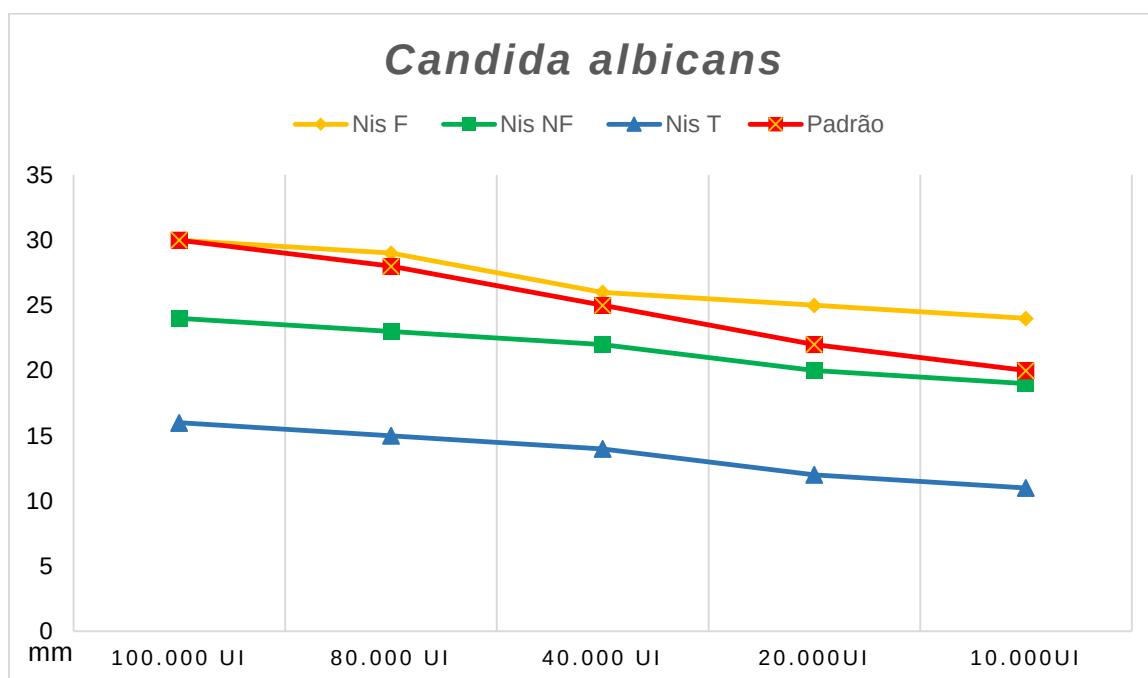


Gráfico 1: Demonstrativo de halos de inibição de acordo com a concentração.

O teste de sensibilidade para fungos é motivo de grande preocupação para micologista de todo mundo que salientam a falta de padronização como seu problema principal. Os estudos realizados por Rex et al, 1997, demonstraram as dificuldades de padronização dos testes para antifúngicos, entre os quais fotossensibilidade e inativação da droga por determinadas substâncias antagônicas presentes no meio de cultura, instabilidade de pH e taxa lenta de crescimento de certos fungos. A baixa hidrossolubilidade e o fato de não se incorporarem facilmente aos meios aquosos de cultura ou no preparo das diluições, também é um problema para realização dos testes.

A falta de consensos para preparação do inóculo traz alguns inconvenientes e existe uma preocupação geral, entre especialistas na busca de metodologia que permitam resultados comparados e reprodutíveis, adequadas a diferentes realidades e necessidades do laboratório que as executam. Todas elas visam chegar ao denominador comum para avaliação da sensibilidade dos fungos frente aos antifúngicos. Não há menção da existência de um método de referência para avaliar a eficácia da nistatina no presente estudo.

A Farmacopeia Brasileira 5ª edição fala que amostras de Nistatina devem ser analisadas perante a cepa de *Saccharomyces* spp para halos de inibição em difusão de ágar em ensaio microbiológico. Este método foi utilizado com a finalidade comparativa dos halos de inibição formados pelos fármacos testes em perante as cepas de *Saccharomyces cerevisiae* e *Candida albicans*.

Fármaco/concentração	100.000 UI	80.000 UI	40.000 UI	20.000 UI	10.000 UI
Nis F	30 mm	28 mm	27 mm	26 mm	25 mm
Nis NF	27 mm	25 mm	24 mm	22 mm	20 mm
Nis T	18 mm	17 mm	16 mm	15 mm	14 mm
Padrão	28 mm	27 mm	26 mm	24 mm	22 mm

Tabela 2: Demonstrativo de pesquisa para amostras perante a cepa *Saccharomyces* spp.

A amostra Nis F obteve o mesmo halo de inibição que comparada à amostra Nis F com cepa de *Candida* apresentando valor próximo ao padrão. Já a amostra Nis NF ficou próxima ao padrão realizado com cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, porém quando comparadas a *Candida* suas inibições foram menores que a esperada e que o padrão.

Com relação à amostra Nis T também apresentou valores inferiores à amostra padrão para *Saccharomyces cerevisiae* e para *Candida albicans*.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS



Conclui-se que a metodologia proposta apresenta limitações o que prejudicou o desenvolvimento da análise visto que para pesquisa com antifúngicos os padrões de referência não são estabelecidos interferindo na finalização da pesquisa de sensibilidade do antifúngico teste.

Foi possível realizar um comparativo entre as amostras manipuladas quando analisados os valores de halos de inibição perante a cepa de *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, observou-se que perante as duas cepas a amostra de Nistatina F e NF foram as mais próximas ao padrão desenvolvido com a Nistatina pó conforme Farmacopeia Brasileira.

REFERÊNCIAS

AKPAN, A. AND MORGAN, R. **Oral candidiasis**. Postgraduate Medical Journal. 2002

ÁLVARES, Cassiana Aparecida et al. **Candidíase vulvovaginal: fatores predisponentes do hospedeiro e virulência das leveduras**. 2014

ANDERSON, J.B. **Evolution of antifungal-drug resistance: mechanisms and pathogen fitness**. Nat Rev Microbiol 3, 547-56 (2005).

ARENDRUP, M. C. **Epidemiology of invasive candidiasis**. Curr Opin Crit Care 16: 445-452, 2010.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira: Substâncias farmacêuticas químicas, vegetais e biológicas. Medicamentos e correlatos**. Volume 1 / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 5 ed. Brasília: Anvisa, 2010. 546p.

BRASIL. Lei nº 5991, de 17 de dezembro de 1973. **Dispõe sobre o controle sanitário do comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos, e dá outras providências**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 19 de dez. 1973.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de vigilância em saúde. Departamento de vigilância epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso / Ministério da saúde, secretaria de vigilância em saúde, departamento de**



vigilância epidemiológica – 8. Ed. rev. – Brasília: ministério da saúde, 2010. 444 p.: Il. – (série B. Textos básicos em saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8. ed. Brasília: Editora MS, 2010.

BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Controle dos cânceres do colo do útero e da mama**. n. 13. Brasília: Editora MS, 2006.

BROOKS, G.F.; BUTEL, J.S.; MORSE, S.A. **Jawetz, Melnick & Adelberg Microbiologia Médica**. 21 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2000.

BRUNTON LL, Chabner BA, Knollmann BC. **As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman**. AMGH editora Ltda. 12 ed. 2012

CARSON KR, GOODEL GG, MACCLANAHAN SB. **Comaparision of the antimicrobial activity of six irrigants on primary endodontic pathogens**. 31- 471-473 2005.

COLOMBO AL, Gimarães T. **Epidemiologia das infecções hematogênicas por Candida spp**. Rev Soc Bras Med Trop 2003; 36(5): 599-607

CORRIGAN EM, CLANCY RL, DUNKLEY ML, EYERS FM, BEAGLEY KW. **Cellular immunity in recurrent vulvovaginal candidiasis**. Clin Exp Immunol. 1998;111(3):574-8.

DAN M, POCH F, LEVIN D. **High rate of vaginal infections caused by non-C. albicans species among asymptomatic women**. Med Mycol. 2002.

DIGNANI MC, SOLOMKIN JS, ANAISSIE EJ. **Candida**. Mycology. 2nd ed., Amsterdam: Elsevier, 2009.

Feuerschuette OTM, Silveira SK, Feuerschuette I, Corrêa T, Grando L, repa ni **A. Candidíase vaginal recorrente: manejo clínico**. Femina. 2010.

GOMES, C.L; CAVALCANTE, J.E; CUNHA, F.A; AMORIM, L.N; MENEZES, E.A. **Identificação e perfil de sensibilidade de Candida spp. isoladas de urina de pacientes com candidíase em Iguatu-Ceará**. Rev Bras Anal Clin 42: 223-225, 2010.



GOSWAMI D, G.R. *et al.* **Pattern of *Candida* species isolated from patients with diabetes mellitus and vulvovaginal candidiasis and their response to single dose oral fluconazole therapy.** *Antimicrob Agents Chemother*, v. 49, n. 6, p. 2336-42, 2005.

Guarro J, Gené J, Stchigel AM. **Developments in fungal taxonomy.** Clin Microbiol Rev 1999; 12(3): 454-500

JÚNIOR, M. de S. G. **ABC da farmácia.** São Paulo: Organização Andrei Editora Ltda, 1992.

KURTZMANN, C. P.; FELL, J. W. **The Yeast: a taxonomic study.** 4th ed. Amsterdam: Elsevier, 1998.

LEVY, Carlos Emílio. **Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde.** São Paulo: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004. v.1, p. 12-20, 64.

Lupi O, Tying SK, McGinnis MR. **Tropical dermatology: fungal tropical diseases.** J Am Acad Dermatol. 2005;53:931-51

Magee BB, Magee PT. **Recent advances in the genomic analysis of *Candida albicans*.** Rev Iberoam Micol 2005; 22: 187-193.

MARDH PA, RODRIGUES AG, GENC M, NOVIKOVA N, MARTINEZ-DE-OLIVEIRA J, GUASCHINO S. **Facts and myths on recurrent vulvovaginal candidosis-a review on epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, pathogenesis and therapy.** Int J STD AIDS. 2002.

MENEZES, E.A; CUNHA, M.C.S. O; CUNHA, F.A. **Identificação Preliminar de Algumas Espécies do Gênero *Candida* spp. em Meio Cromógeno: Resultados de Dois Anos de um Estudo Multicêntrico Realizado no Ceará.** Rev Patol Trop 40: 297-303 2011

MENEZES, E.A, MARINHO, J.A.S; ÂNGELO, M.R.F; CUNHA, M.C.S.O; CUNHA, F.A; VASCONCELOS, A.A. **Isolation and Antifungal Susceptibility Testing of *Trichosporon asahii* In Ceará, Brazil.** Rev Inst Med Trop São Paulo 54: 1-3, 2012.



MENEZES, E.A; MENDES L.G; Cunha F.A. **Resistência a antifúngicos de *Candida tropicalis* isoladas no Estado Ceará.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 42: 1-2, 2009.

MINAMI, Paulo S. Micologia: **Métodos Laboratoriais de Diagnóstico das Micoses.** 1 ed. São Paulo: Manole Ltda., 2003.

Monge RA, Román E, Nombela C, Pla J. **The MAP kinases signal transduction network in *Candida albicans*.** Microbiology 2006; 152: 905-912

MORAGUES, M.D. *et al.* **A monoclonal antibody directed against a *Candida albicans* cell wall annoprotein exerts three anti-*C. albicans* activities.** *Infec Immun*, v. 71, p. 5273-79, 2003.

Naglik JR, Challacombe J, Hube B. ***Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis.** Microbiol Mol Biol R 2003; 67(3): 400-428.

NCCLS. **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição de bactéria de crescimento aeróbico** - 2007. Disponível: http://anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/clsi/clsi_OPASM7_A6.pdf. Acesso em 15/05/18.

NUCCI, M; QUEIROZ-TELLES, F; TOBÓN, A.M; RESTREPO, A; COLOMBO, A.L. **Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America.** Clin Infect Dis 51: 561-570 2010

PEREA, S. AND PATTERSON, T.F. **Invasive *Aspergillus* infections in hematologic malignancy patient.** Semin. Respir. Infect 17, 99-105. 2002

PEREIRA JV, BERGAMO DCB, PEREIRA JO, FRANÇA SC, PIETRO RCLR, SILVA SOUZA YC. **Antimicrobial activity of archium lappa constituents against microorganisms commonly found in endodontic infection braz dente j** 16 192-196, 2005.

PERON, MLDF; TEIXEIRA, JJV; SVIDZINSKI, TIE. **Epidemiologia e etiologia das dermatomicoses superficiais e cutâneas na Região de Paranavaí** - Paraná, Brasil. Rev Bras Ana Clín, v. 37, n. 2, p. 79-83, 2005.



PFALLER MA, DIEKEMA DJ. **Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem.** Clin Microbiol Rev. 2007; 20(1):133-63

RANG, H.P; DALE M.M; RITTER, J.M. **Farmacologia.** 2004. Editora: Elsevier Medicina.

REX JH, PFALLER MA, GALGANI JN, BETLETT MS, ESPINEL-INGROFF A, GHANNOUM MA ET AL. **Development of interpretive breakpoints for antifungal susceptibility testing conceptual framework and analysis of in vitro correlation data for fluconazole, itraconazole, and Candida infections.** Clin Infect Dis, 24 235-247. 1997

RYLANDER E, BERGLUND AL, KRASSNY C, PETRINI B. **Vulvovaginal candida young sexually active population: prevalence and association with orogenital sex and frequent pain at intercourse.** Sex Transm Infect 2004.

SHEPPERD, D.; LAMPIRIS, H.W. **Farmacologia Básica e Clínica. Agentes antifúngicos.** McGraw-hill. 10,707-714. 2008

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

TIRASCHI IN, CARNOVALE S, BENETUCCI A, FERNÁNDEZ N, KURLAT I ET AL. **Brote de candidemia por Candida albicans em neonatologia.** Rev Iberoam Micol 2007; 24: 263-267.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S. AND COSTE, A.T. **Antifungal Resistance and New Strategies to Control Fungal Infections.** 2012

VASCONCELOS, A.A; MENEZES, E.A; CUNHA, F.A. **Chromogenic Medium for Direct Susceptibility Testing of Candida spp. Isolated from Urine.** Mycopathologia 171: 125-130, 2011.

VAZQUEZ A, et al. **Global protein function prediction from protein-protein interaction networks.** 2003. Nat Biotechnol 21(6):697-700

WINNER, H. S.; HURLEY, R. **Candida albicans.** London: Churchill, 1964.

ZIARRUSTA GB. **Vulvovaginitis candidiásica.** Rev Iberoam Micol ;19: 22-24. 2002.