
Ciências biológicas

Lídia de Azevedo Duarte

**Análise da susceptibilidade de leveduras
isoladas de insetos sociais
aos antifúngicos**



Rio Claro
2012

LÍDIA DE AZEVEDO DUARTE

ANÁLISE DA SUSCEPTIBILIDADE DE LEVEDURAS ISOLADAS DE
INSETOS SOCIAIS AOS ANTIFÚNGICOS

Orientador: FERNANDO CARLOS PAGNOCCA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências da Universidade
Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” -
Câmpus de Rio Claro, para obtenção do grau de
Bacharel em Ciências biológicas.

Rio Claro
2012

595.796 Duarte, Lída de Azevedo
D812a Análise da susceptibilidade de leveduras isoladas de
insetos sociais aos antifúngicos / Lída de Azevedo Duarte. -
Rio Claro : [s.n.], 2012
44 f. : il., gráfs., tabs., fots.

Trabalho de conclusão de curso (Ciências biológicas) -
Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de
Rio Claro
Orientador: Fernando Carlos Pagnocca

1. Formiga. 2. Formigas Attini. 3. Leveduras
oportunistas. 4. Resistência. 5. Meio ambiente. I. Título.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial aos meus pais, Thelma e Marcos, por serem responsáveis pela pessoa que sou hoje, pela oportunidade que me proporcionaram de chegar até aqui e pelo apoio e amor oferecido durante toda a minha vida. Aos meus irmãos, Thiago e Marina, pelo apoio, amor e bons momentos proporcionados. Aos meus avós, Antonieta, Ivan, Augusto e Therezinha, responsáveis por me transmitir a grande sabedoria de vida que possuem, pela participação ativa na minha vida e educação, e por proporcionarem a oportunidade de conclusão da minha graduação. Às minhas tias Marta e Renata e ao meu tio Alexandre, por me receberem com muita disposição no laboratório da CPQBA/UNICAMP, pelo conhecimento transmitido e por todo apoio, amizade e amor oferecido durante toda a minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela confiança que em mim sempre depositou, pelos incentivos com relação à minha vida profissional, pela sabedoria transmitida e pela amizade.

À Prof^a. Dra. Márcia Melhem, que com grande paciência me recepcionou no Instituto Adolf Lutz, sempre com muita disposição e bom humor para me ensinar grande parte dos conceitos fundamentais para realização deste trabalho. Agradeço também a todos os demais pesquisadores do Instituto Adolf Lutz de Rio Claro, que me ajudaram e me receberam tão bem.

Agradeço a todos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais, Paixão, Silvio, Ife, Virginia, Noemi, Ana Paula, Derlene, Samuel, Francisco e todos os demais que me proporcionaram momentos mais agradáveis no ambiente de trabalho, pelos conhecimentos transmitidos, pela prontidão da ajuda e pela amizade.

Agradeço às Dras. Aline Silva e Lucimeire Ramos de Souza Lacau, pela coleta dos ninhos de formiga utilizados neste trabalho.

Às minhas amigas e amigos que colaboraram com a construção da minha caminhada na universidade, em especial Pedrita, Miss, Carioca, Dani, Malu, Puca, Vanessa, Luá, Jussara, Letícia, Lary, Biga, Bia, Tibu, Mil e toda a família CBI 2009, por fazer desses quatro anos mais especiais e memoráveis, com a certeza de que formamos uma turma excepcional.

À minha grande amiga, Maricota, pela paciência, companheirismo, amizade e harmonia com que moramos juntas nestes quatro anos de faculdade. Obrigada por todas as conversas, desabafos, risadas, choros e por ter sido uma companhia tão agradável de conviver durante toda a graduação.

Ao meu namorado, Rafael, que me transmitiu carinho, amor e companheirismo nas horas necessárias. Obrigada pela paciência nos momentos de desespero, por muitas vezes em que me buscou tarde da noite no laboratório e pela prontidão que sempre demonstrou para me ajudar. Serei sempre muito grata por ter construído comigo três maravilhosos anos de namoro e faculdade.

Obrigada à Cia Éxciton, que com certeza fez com que minha graduação fosse mais completa e realizada, além de colaborar enormemente com meu crescimento pessoal. Agradeço a todos os integrantes por todas as risadas, crises de relacionamento em grupo e por me fazerem mais feliz todas as segundas e quartas-feiras (“eu preciso de vocês!” rsrs).

À CNPQ pelo financiamento deste trabalho.

Enfim, a todos que tornaram possível, direta ou indiretamente, a realização deste trabalho, meu sincero Muito Obrigado!

“Os segredos do universo estão gravados nas células do seu corpo.”

O caminho do guerreiro pacífico,

Dan Milman

RESUMO

A frequência de micoses invasivas causadas por fungos oportunistas, incluindo leveduriformes, vem aumentando significativamente nas últimas décadas e atinge principalmente indivíduos imunocomprometidos. A tribo Attini possui cerca de 230 espécies de formigas e todas possuem o hábito de cultivar e se alimentar de fungos. Algumas espécies cultivam o fungo mutualista em nódulos poligonais sólidos com 0,25 a 0,50mm de diâmetro, aproximadamente. No interior desses nódulos, encontram-se células na forma de leveduras, que quando semeadas em meio de cultura se desenvolvem como fungo filamentoso. Este tipo de fungicultura está restrito a algumas espécies do gênero *Cyphomyrmex*. Neste trabalho, isolamos 30 leveduras dos nódulos de oito ninhos de *Cyphomyrmex transversus* da região de Ilhéus (BA), e analisamos a susceptibilidade aos seguintes antifúngicos: Anfotericina B (AMB), Fluconazol (FCZ), Voriconazol (VCZ) e Itraconazol (ITZ). A caracterização das estirpes foi feita através de métodos morfológicos e moleculares, incluindo-se o sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA. A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através do método de microdiluição, de acordo com a norma M27-A2 (CLSI, 2002). *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e *Candida krusei* ATCC 6258 foram utilizadas como controle. Os resultados foram interpretados segundo os pontos de corte (*breakpoints*) aplicados ao gênero *Candida*. As estirpes foram identificadas como *Trichosporon asahii* (18), *T. coremiiforme* (4), *Candida carpophila* (syn. *C. guilliermondii*) (4), *Galactomyces candidum* (syn. *Geotrichum candidum*) (3) e *Cryptococcus laurentii* (1). Todas as espécies são conhecidas por possuírem representantes que já foram relatados como patógenos oportunistas. Elas foram sensíveis aos azóis FCZ, VCZ e ITZ, com exceção de *G. candidus*, cujas estirpes apresentaram sensibilidade dose-dependente a FCZ e ITZ. Também alguns isolados de *T. asahi*, *T. coremiiforme* e *C. carpophila* demonstraram susceptibilidade dose-dependente ao ITZ. Em relação à AMB, observamos resistência em oito estirpes, distribuídas em dois gêneros. Devido à falta de estudos semelhantes, não se conhece até o momento o potencial de disseminação desses micro-organismos pelas formigas, mas considerando-se que seus ninhos podem abrigar estirpes resistentes a alguns dos antifúngicos mais utilizados em casos clínicos, estudos adicionais deveriam ser realizados para ampliarmos o nosso conhecimento em relação a esses fatores.

Palavras-chave: Formigas Attini. Leveduras oportunistas. Resistência.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
1.1	Agentes antifúngicos	7
1.1.1	Anfotericina B	8
1.1.2	Azóis	9
1.2	Leveduras e formigas Attini	10
2	OBJETIVOS	12
3	MATERIAIS E MÉTODOS	13
3.1	Coleta e isolamento das leveduras	13
3.2	Identificação das leveduras	13
3.3	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)	14
3.3.1	Preparação dos agentes antifúngicos	15
3.3.2	CHROMagar Candida® e preparação do cultivo de 24h	16
3.3.3	Preparação da placa e realização do teste	16
3.4	Análise dos resultados	17
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1	Coleta e isolamento	19
4.2	Identificação das estirpes	21
4.3	Teste de microdiluição para determinação da CIM	25
5	CONCLUSÃO	36
	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICE A – RESULTADOS DETALHADOS	41
	ANEXO A – CONSTITUINTES DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS	42

1 INTRODUÇÃO

A frequência de micoses invasivas causadas por fungos patógenos oportunistas vem aumentando significativamente nas últimas décadas (PFALLER; DIEKEMA, 2004). Este aumento está diretamente relacionado ao elevado número de pacientes suscetíveis ao desenvolvimento de doenças fúngicas graves, o que inclui os indivíduos imunocomprometidos como, por exemplo, os pacientes submetidos a transplante de órgãos sólidos, além de portadores da AIDS, de doenças hematológicas, idosos e recém-nascidos (PFALLER; DIEKEMA, 2004; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Infecções fúngicas graves estão sendo relatadas com uma amplitude cada vez maior de patógenos, incluindo os conhecidos oportunistas *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Aspergillus fumigatus*. Porém, novos e emergentes fungos patógenos também incluem espécies de leveduras, como *Trichosporon spp* e *Rhodotorula spp*, os quais apresentam problemas específicos com respeito à resistência a antifúngicos. Além disso, eles podem ocupar diversos nichos, como os ambientes aquáticos, alimentos, água e podem fazer parte da microbiota humana (PFALLER; DIEKEMA, 2004).

1.1 Agentes antifúngicos

O aumento de tratamentos médicos com imunossupressores desde a década de 1970 elevou a frequência de casos clínicos com micoses fatais e, consequentemente, estimulou o desenvolvimento de pesquisas para a descoberta de novos antifúngicos (ODDS et al., 2003). O antifúngico ideal deve apresentar um amplo espectro de atividade fungicida sem, no entanto, proporcionar toxicidade ao hospedeiro (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Porém, os micro-organismos eucariotos, como as leveduras, utilizam processos metabólicos semelhantes para sintetizar suas proteínas e ácidos nucleicos, tornando-se mais difícil encontrar um ponto de toxicidade seletiva (TORTORA et al., 2005). Com isso, o número de drogas antifúngicas disponíveis é reduzido e, como consequência de sua ampla utilização, há um aumento do número de cepas resistentes, dificultando ainda mais os tratamentos.

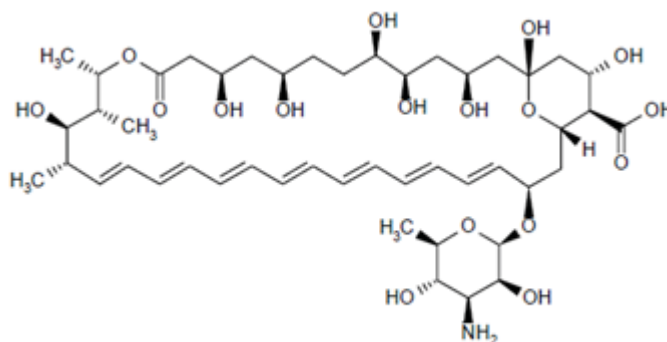
As diferentes classes de antifúngicos possuem um alvo específico de atuação na célula fúngica. Assim, os locais de ação das drogas antifúngicas incluem a parede celular (equinocandinas, por exemplo), membrana plasmática (polienos e azóis, por exemplo), síntese de DNA e RNA (flucitosina), síntese de proteínas (sordarina) e a formação de microtúbulos (griseofulvina). Entretanto, os antifúngicos mais amplamente utilizados nas práticas clínicas

são os que atuam na membrana plasmática e, mais especificamente, no esterol da membrana fúngica, o ergosterol (ODDS et al., 2003). O ergosterol é o principal componente da membrana celular dos fungos e sua função essencial é como biorregulador da fluidez da membrana, a assimetria e integridade da membrana celular (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Já o principal esterol da membrana plasmática das células dos mamíferos é o colesterol, o que justifica o fato do ergosterol se apresentar como um dos principais alvos dos antifúngicos, pois é um importante ponto de toxicidade seletiva (TORTORA et al., 2005).

1.1.1 Anfotericina B

A anfotericina B (figura 1) está incluída no grupo dos antifúngicos polienos, que se caracterizam por uma estrutura de 26 a 28 anéis de carbono com poliinsaturações, fechados por um éster ou lactona, e onde grupos hidroxil conferem caráter anfipático à molécula (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Este é o fármaco de primeira escolha para diversos tratamentos de infecções fúngicas. Seu modo de ação na célula é baseado na ligação hidrofóbica de oito moléculas de anfotericina B ao ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade desta. Isto causa o extravasamento do conteúdo citoplasmático e a consequente morte celular. Porém, este antifúngico possui capacidade reduzida de diferenciar o ergosterol da membrana celular de fungos do colesterol da membrana celular de mamíferos, podendo acarretar toxicidade, especialmente nos rins (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). No entanto, uma redução da toxicidade desta droga antifúngica pode ser conseguida através de combinações com lipídeos, como seu encapsulamento em lipossomos (ODDS et al., 2003).

O principal interesse clínico com relação à anfotericina B é que isolados resistentes raramente são encontrados nos pacientes, e mutantes resistentes são dificilmente obtidos em laboratório (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Figura 1 - Anfotericina B

Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006).

1.1.2 Azóis

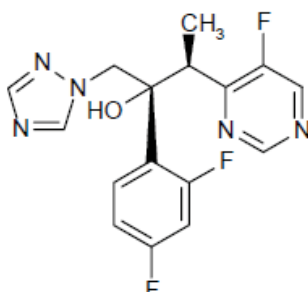
A primeira geração destas drogas antifúngicas foram os imidazóis N-substituídos, os quais surgiram no final da década de 1960. Mais tarde surgiram os triazóis (fluconazol e itraconazol) e os novos derivados dos triazóis (voriconazol, ravuconazol, posaconazol e albaconazol) (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Inicialmente, os derivados imidazólicos apresentavam um complexo mecanismo de ação, onde inibiam diversas enzimas e a biossíntese de lipídios da membrana. Porém, devido ao fato destas mesmas enzimas realizarem a biossíntese de colesterol em células hepáticas de mamíferos, estes antifúngicos causavam sérios efeitos adversos. No entanto, os triazóis são menos tóxicos por apresentarem um alvo de maior especificidade. Os azóis fluconazol, voriconazol, itraconazol e posaconazol inibem a enzima 14-alfa-desmetilase do lanosterol do citocromo P-450, a qual é codificada pelo gene ERG11 e está relacionada com a biossíntese de ergosterol. Mutações neste gene podem conferir resistência ao fluconazol em leveduras (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

O citocromo P-450 contém um grupo heme férrico, onde os antifúngicos azóis se ligam através dos nitrogênios não substituídos localizados nos anéis de imidazol ou triazol. O restante da molécula do azol se liga à apoproteína do citocromo de acordo com a característica estrutural da proteína, pois a conformação exata do sítio ativo difere entre as espécies de fungos e também de mamíferos. Portanto, a natureza da interação entre cada molécula do azol e cada tipo de P-450 determina o grau de efeito inibidor do azol nas diversas espécies fúngicas (ODDS et al., 2003).

O voriconazol (figura 2) é um antifúngico triazólico sintético com amplo espectro de atividade *in vitro* e alto potencial de ação, sendo ativo frente a diversas infecções fúngicas. O início de sua comercialização em vários países se deu em 2002 (MOREIRA et al., 2010).

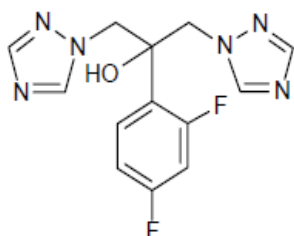
Figura 2 - voriconazol



Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006)

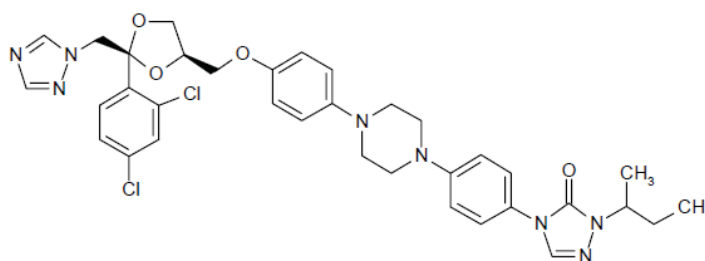
O fluconazol e o itraconazol tem recebido bastante destaque, pois ambos possuem amplo espectro de ação e toxicidade reduzida. No entanto, devido a grande utilização desses antifúngicos, há um desenvolvimento de resistência entre os fungos, principalmente com relação ao gênero *Candida* (NOBRE et al., 2002).

Figura 3 - fluconazol



Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006)

Figura 4 - itraconazol



Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006)

1.2 Leveduras e formigas Attini

A tribo Attini é composta por 15 gêneros e aproximadamente 230 espécies de formigas (KEMPF, 1972 apud SCHULTZ; MEIER, 1995; BRANDÃO; MAYHÉ-NUNES, 2001; KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009) restritas ao continente americano, onde são encontradas desde o sul da Argentina até o sul dos Estados Unidos (WEBER, 1966, 1972; MAYHÉ-NUNES; JAFFÉ, 1998). O cultivo de fungos pelas formigas da tribo Attini representa um exemplo clássico de mutualismo, pois estas formigas dependem obrigatoriamente do cultivo desses micro-organismos para obter alimento e em troca

fornece alimentação, dispersão e proteção contra patógenos e competidores (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).

A tribo Attini é dividida em cinco sistemas de cultura caracterizados pela relação filogenética entre as formigas, o fungo cultivado e seus patógenos. Num desses sistemas temos o denominado “cultivo de leveduras” (*yeast agriculture*), praticado por 18 espécies descritas dentro do complexo “*Cyphomyrmex rimosus*”, um conjunto de espécies da tribo Attini dentro do gênero *Cyphomyrmex* (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).

O gênero *Cyphomyrmex* é tradicionalmente dividido em dois grupos: *C. strigatus* e *C. rimosus*. Todas as espécies dentro do grupo *C. strigatus* praticam a fungicultura basal, a qual se acredita ser o primeiro sistema de fungicultura das formigas Attini, e seus cultivares de fungos são separados em duas linhagens dentro da tribo Leucoprineae (MEHDIABADI et al., 2012). Porém, as espécies dentro do grupo *C. rimosus* cultivam seu fungo mutualista na forma de levedura. Isto ocorre em nódulos poligonais sólidos com 0,25 a 0,50mm de diâmetro, aproximadamente. Estes nódulos estão repletos de células de leveduras na fase unicelular, ao contrário dos outros grupos da tribo Attini que cultivam seus fungos mutualistas como micélio (fase multicelular). Em laboratório, quando essas células em forma de levedura são cultivadas em meio de cultura, elas se desenvolvem como micélio, assim como os demais fungos cultivados pelas demais formigas da tribo Attini. Além disso, quando presentes nos ninhos, crescem como leveduras no jardim de fungos e como micélio nos corpos das larvas (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010).

A espécie *Cyphomyrmex transversus* pertence ao grupo *rimosus* e é encontrada do nordeste do Brasil até a Argentina Central. As operárias dessa espécie se caracterizam por uma cor marrom-amarelada a marrom fusco e o comprimento varia entre 2,7 a 3,4mm. O processo de forrageamento dessa espécie se baseia na coleta e transporte de substratos como, por exemplo, sementes de gramíneas, fragmentos de vegetais em processo de decomposição, carcaças, fezes de insetos e aves. Estes materiais são levados para dentro do ninho e depositados no fungo. Ao final desse processo a formiga umedece e dispersa os nódulos de leveduras (LACAU, 2006). *Cyphomyrmex transversus* é abundante no sul da Bahia e constrói seus ninhos dentro ou sob frutos secos de cocos caídos na restinga (LACAU, 2006). Segundo Lacau (2006), essa nidificação característica pode se relacionar ao fato do coco representar uma barreira física protetora contra condições ambientais adversas (vento e chuva, por exemplo) e contra predadores. Além disso, o posicionamento do coco no chão colabora com a manutenção da umidade do ninho construído sob o fruto.

2 OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- I. Realizar o isolamento das estirpes de leveduras presentes nos nódulos de oito ninhos de *Cyphomyrmex transversus*;
- II. Identificação taxonômica das 30 estirpes isoladas;
- III. Determinar o nível de suscetibilidade desses micro-organismos em relação a quatro antifúngicos tradicionais: anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Coleta e isolamento das leveduras

A fonte de isolamento das estirpes de leveduras foram oito ninhos de *Cyphomyrmex transversus* localizados em Ponta da Tulha (14°28'S 39°02'W), Ilhéus-BA. Todos os ninhos foram encontrados e coletados sob cascas de cocos caídos na areia. As coletas foram realizadas pelas Dras. Aline Silva e Lucimeire Ramos de Souza Lacau e enviadas ao laboratório de Microbiologia do CEIS-Unesp, Rio Claro.

No laboratório, foram coletados alguns desses nódulos, os quais foram colocados sobre uma gota de água esterilizada depositada numa lâmina de vidro. Cuidadosamente, os nódulos foram esmagados com auxílio de uma lamínula, revelando a presença de células leveduriformes em seu interior, como era esperado. Com auxílio de uma micropipeta, foram retiradas amostras de 10 µL da suspensão e semeadas em meio *Sabouraud dextrose Agar* (Acumedia®) (Anexo A - Tabela 5), com cloranfenicol. Após 5 dias de incubação a 25°C as colônias com aspecto de levedura foram isoladas e mantidas sob refrigeração em meio GYMP a 8°C e crio-preservadas a -80°C em meio contendo glicerol 15%.

3.2 Identificação das leveduras

As leveduras foram caracterizadas por métodos polifásicos. Primeiramente, elas foram reativadas em meio *Sabouraud dextrose Agar*, incubadas a 25°C por 48h e, posteriormente, observadas macro e microscopicamente. A partir desta primeira análise morfológica foi possível fazer um agrupamento inicial que serviu para o posicionamento das estirpes no gel de microssatélite (MSP-PCR), para a análise molecular comparativa. Para a técnica de MSP-PCR, primeiramente, foi feita a extração de DNA adicionando em tubo “eppendorf” 500µL de solução de lise, esferas de vidro e cerca de duas alçadas cheias de levedura. O tubo foi agitado no vórtex por 8 minutos e colocado em banho-maria por 2h a 65°C. Após centrifugar por 15 minutos a 13.000 rpm, foi recuperada a fase aquosa com o DNA [modificado de Sampaio et.al (2001)]. Posteriormente, foi feita a mistura da PCR com os reagentes necessários: dNTPs, Buffer 10x, MgCl₂, água de PCR, Taq polimerase e primer (GTG₅). Adicionou-se a esta reação o DNA bruto previamente extraído. Para a amplificação utilizou-se o programa “MSP-PCR” do termociclador (95°C/ 3 min; seguido de 40 ciclos a 93 °C/45s, 50 °C/1 min, 72 °C/1 min e extensão final de 72 °C/6min, 10 °C/∞). O gel foi preparado com 1,4% de agarose em

TBE 0,5%. A eletroforese foi realizada em 90V, 50mA por 3 horas e meia. Após finalizada, o gel foi banhado em uma solução contendo o corante Gel Red [modificado de Meyer et al. (1993)] e em seguida visualizado. Esta técnica permitiu que os isolados fossem agrupados em cinco grupos com diferentes padrões de banda. Para a etapa seguinte, de identificação via sequenciamento, foram selecionadas duas estirpes de cada grupo, com exceção do grupo que era formado por apenas um isolado.

Para a etapa de sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA, primeiramente os DNAs foram amplificados pela técnica de PCR, utilizando os primers NL1 e NL4 e o sucesso da amplificação foi verificado através de uma eletroforese em gel de agarose 1% em TBE1X (KURTZMAN & ROBNETT, 1998). As amostras foram aplicadas no gel acrescidas de GelRed e o processo ocorreu a 50mA e 100V, durante 40 minutos. Após esta etapa, foi realizada uma purificação dos produtos de amplificação com o GFX PCR DNA *and gel band purification kit* (GE Healthcare). A verificação da purificação também foi realizada através de uma eletroforese em gel de agarose, nas mesmas condições que o gel de PCR. Os DNAs foram quantificados no equipamento Nanodrop e após certificar que todas as amostras possuíam valores entre 5ng a 20ng, deu-se prosseguimento na preparação para a reação de sequenciamento. Para isto, foram utilizados os primers NL1 e NL4 e a reação foi realizada no termociclador por 2h e 40 minutos. Posteriormente, foi realizada a purificação da reação de sequenciamento, onde foi utilizada solução de EDTA 125mM, acetato de sódio 3M, etanol 100% e etanol 70%, nas devidas proporções. Finalmente, as amostras foram aplicadas no sequenciador ABI 3500, e as sequencias daí obtidas foram editadas e alinhadas no programa BioEdit Sequence Aligment Editor. A sequencia consenso obtida foi aplicada na base de dados BLASTN do *National Center for Biotechnology Information-Genbank* (NCBI-GenBank), e na base dados CBS-KNAW. As sequencias com mais de 98% de similaridade com as apresentadas pelas bases de dados foram consideradas como sendo da mesma espécie.

3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impossibilita o crescimento visível do micro-organismo em teste (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2002). Dessa forma, as CIMs das estirpes foram determinadas através do método de microdiluição em microplaca de 96 poços, de acordo com a norma M27-A2 (CLSI, 2002).

3.3.1 Preparação dos agentes antifúngicos

A anfotericina B (Sigma®), o Itraconazol (Jai Radhe SA) e o voriconazol (Sigma®) foram preparados a partir de diluições em dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto o fluconazol (Polydrug Laboratórios) foi diluído em água deionizada esterilizada. No caso da anfotericina B e do itraconazol foi necessário realizar ajustes das concentrações, pois apresentavam potências de 80% e 22%, respectivamente, o que poderia resultar em falsos resultados. O cálculo de ajuste foi realizado de acordo com a norma M27-A2 (CLSI, 2002). Para o fluconazol e voriconazol não foram necessários esses ajustes, pois já possuíam potência de 100%.

Inicialmente foram preparadas “soluções estoque” com concentração de 5.120 mg/L para o fluconazol e 1.600 mg/L para os outros três antifúngicos. A partir destas soluções foram realizadas 10 diluições 1:1 de modo obter concentrações na faixa de 1600 mg/L a 3, 13 mg/L para anfotericina B, itraconazol e voriconazol, e uma diluição 1:7 seguida de nove diluições 1:1 para fluconazol, determinando concentrações na faixa de 640 mg/L a 1, 25 mg/L para este antifúngico. Destas, para anfotericina B, itraconazol e voriconazol foram preparadas diluições centesimais correspondentes, as quais foram utilizadas nas placas de testes e resultaram nos valores de 16mg/L a 0,0313mg/L. Para o fluconazol foram realizadas diluições decimais, determinando sua faixa de concentração de 64 mg/L a 0,12mg/L (CLSI, 2002). Todas as diluições foram realizadas em meio RPMI-1640 (com glutamina e sem bicarbonato; Sigma®) (Anexo A – Tabela 7).

A preparação do meio RPMI-1640 foi realizada de acordo com a norma M27-A2 (CLSI, 2002), sendo diluído nas concentrações recomendadas. O pH foi ajustado em 7,0 e foi adicionado tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) com concentração de 0,165M. Posteriormente, foi realizada a esterilização do meio por filtração à vácuo. O frasco foi embrulhado em papel alumínio devido à fotossensibilidade do meio de cultura e armazenado em geladeira.

As “soluções-estoque” dos antifúngicos foram mantidas em freezer -80°C para não ocorrer perda significativa de atividade, conforme recomendado pela norma CLSI (2002). As diluições subsequentes foram mantidas em freezer -20°C, pois eram utilizadas com maior frequência. Sabe-se que a anfotericina B possui alto nível de fotossensibilidade e, portanto, todos os frascos contendo este antifúngico foram envoltos por papel alumínio antes de serem armazenados.

3.3.2 CHROMagar Candida® e preparação do cultivo de 24h

As estirpes conservadas em freezer -80°C foram reativadas em meio *Sabouraud dextrose Agar* (SDA). Após 24 horas de incubação a 25°C, os isolados foram repicados para meio CHROMagar Candida (Difco®) (Anexo A – Tabela 6). O cultivo das leveduras nesse meio de cultura tem o objetivo de avaliar a pureza das estirpes, pois possibilita a verificação do comportamento cromogênico dos inóculos e torna fácil a identificação de contaminantes através do aparecimento de diferentes cores na placa. As placas foram incubadas a 25°C por 3 dias.

Após esta etapa, as estirpes foram cultivadas em SDA e incubadas a 25°C por 24h, para posterior utilização nos testes.

3.3.3 Preparação da placa e realização do teste

Foram distribuídos, de forma decrescente, 100 µL do antifúngico em 10 poços de cada linha da microplaca. Foram reservados poços para o controle positivo dos inóculos (100µL do meio RPMI-1640 e 100µL do inóculo) e para o controle do meio (200µL do meio RPMI-1640).

A partir da cultura de 24h em SDA, foi realizada uma suspensão celular em 10mL de solução salina 0,85%. A turbidez foi ajustada de acordo com a escala de McFarland 0,5, a qual corresponde a uma suspensão-padrão de levedura com concentração de fator 10^6 células/mL. Três séries de diluições 1:10 foram realizadas, sendo as duas primeiras em solução salina e a última em meio RPMI-1640, de forma que nesta última a concentração celular atingiu 10^3 células por mL.

Após esse processo, foi aplicado 100 µL da suspensão de levedura em todos os poços de duas linhas da microplaca, as quais já continham o antifúngico, de forma que todas as estirpes foram testadas em duplicata na mesma placa. Com a adição do inóculo, as concentrações dos antifúngicos nos poços caíram para a metade, obtendo-se valores de 8 mg/L a 0,015 mg/L para anfotericina B, voriconazol e itraconazol e 32 mg/L a 0,06 mg/L para o fluconazol. Para o controle do inóculo foram adicionados 100 µL da suspensão de levedura em 100 µL de meio RPMI-1640. Além disso, todos os testes foram refeitos para confirmação do primeiro resultado.

Foram utilizadas as cepas padrão *Candida krusei* ATCC (American Type Culture Collection) 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 em todos os testes, pois suas faixas de MIC já são conhecidas e, portanto, serviram como controle de qualidade do teste. Os valores das faixas de CIM esperadas pelas duas cepas controle foram obtidos a partir da Norma M27-A2.

A incubação foi a 35°C, em estufa com temperatura controlada, durante 48h.

3.4 Análise dos resultados

Foram realizadas leituras visuais após 24h e 48h de incubação e leitura em espectrofotômetro às 48h de incubação.

A análise visual foi realizada com o auxílio de um espelho para a leitura. Para drogas fungicidas, como a Anfotericina B, a determinação da CIM se faz em 100% de inibição, ou seja, na concentração onde não se observa nenhum crescimento. Para drogas fungistáticas, como os azóis, a CIM foi determinada com 50% de inibição. O controle do inóculo foi considerado como 100% de crescimento, com o qual foi realizada a comparação para determinação da CIM.

Para a leitura em espectrofotômetro foi utilizado filtro de 450nm. Esta leitura é realizada para confirmar a leitura visual, sendo importante principalmente para a análise dos resultados das drogas fungistáticas, já que a determinação visual para 50% do crescimento pode possibilitar maior chance de erro. Para estas drogas, a CIM foi determinada pelo valor de absorbância mais próximo da metade do valor do controle do inóculo. Para a anfotericina B, o resultado foi obtido a partir da análise do primeiro poço em que o valor se aproximou de zero.

Os resultados da leitura visual e da absorbância foram comparados para determinação do resultado final.

Valores interpretativos de pontos de corte (*breakpoints*) foram propostos, recentemente, para algumas espécies de *Candida* (CLSI, 2002), os quais foram utilizados para interpretação dos valores de CIM no presente trabalho. Os *breakpoints* são valores de referência, padronizados, utilizados para comparação da CIM obtida para cada isolado (TASSO, 2008). Esses valores apresentam como resistentes os micro-organismos com CIM $\geq 1\mu\text{g/mL}$ para itraconazol, $\geq 64\mu\text{g/mL}$ para fluconazol e $\geq 4\mu\text{g/mL}$ para voriconazol. Porém, existem atualmente valores para *Candida* frente aos azóis, mas não para testes com anfotericina B e, portanto, CIM > 1 mg/L foi usado para atribuir resistência à estirpe, de

acordo com estudos prévios (CLSI 2002; DIEKEMA et al. 2009; GUINEA et al. 2010). Dessa forma, este valor também foi adotado como parâmetro para este trabalho.

Após a obtenção dos valores das CIMs para as estirpes encontradas, as análises foram realizadas incluindo também parâmetros em relação à CIM₅₀ e CIM₉₀, as quais indicam os valores que são capazes de inibir 50% e 90% dos isolados da espécie, respectivamente.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Coleta e isolamento

Os ninhos de *Cyphomyrmex transversus* foram coletados sob cocos caídos na areia em Ponta da Tulha, Ilhéus (BA) (figura 5a). Destes ninhos, foram retirados com assepsia os nódulos que contém células leveduriformes em seu interior (Figura 5b e 5c). Após o período de incubação, observamos o crescimento de fungos com aspecto filamentoso de cor branca (típico do fungo mutualista) e colônias com aparência de leveduras (figura 5d). Neste trabalho, apenas as colônias com aspecto de levedura foram selecionadas e purificadas (figura 5e). Estas estirpes, provavelmente, faziam parte da superfície externa dos nódulos, ocorrendo nos ninhos como contaminantes ocasionais.



Figura 5 - **a.** Local de coleta de um ninho de *Cyphomyrmex transversus*. A seta indica a região em que o ninho se encontrava. **b.** Aspecto de parte do ninho de *Cyphomyrmex transversus*. As setas indicam os nódulos que contém formas leveduriformes no interior. **c.** Perspectiva mais aproximada dos nódulos de levedura, os quais estão indicados pelas setas. **d.** Estirpes isoladas a partir dos nódulos de leveduras. A placa de petri à direita contém apenas fungos com aspecto filamentosos, caracterizando o crescimento típico das leveduras cultivadas dentro dos nódulos. A placa de petri à esquerda contém colônias com aspecto leveduriforme (setas) e filamentosos. **e.** Aspecto macroscópico de duas estirpes isoladas da parte externa do nódulo de levedura.

4.2 Identificação das estirpes

Através das análises macroscópicas, microscópicas e moleculares envolvidas nesta etapa obteve-se o seguinte resultado: dezoito isolados foram identificados como *Trichosporon asahii* (estirpes N2g, N3a, N3b, N3c, N3d, N3e, N3f, N3g, N4ap, N4ap2, N5a, N5c, N5d1, N6k1, N6k2, N6k3, N6k5 e N12a2; Closest relative Genbank accession number JQ665245.1), quatro *Trichosporon coremiiforme* (estirpes N12a1, N12c1, N12c3 e N12d2; Closest relative Genbank accession number JN939454.1), quatro como *Candida carpophila* (syn. *C. guilliermondii*) (N6b1, N8a, N8b, N16a; Closest relative CBS-KNAW accession number isolated H1S0K3) três como *Galactomyces candidum* (syn. *Geotrichum candidum*) (N4af, N4cf, N4df; Closest relative Genbank accession number JN974267.1) e uma estirpe de *Cryptococcus laurentii* (N12d; Closest relative Genbank accession number FN428921.1).

O gênero *Trichosporon* foi relatado como a causa mais comum de leveduras não pertencentes ao gênero *Candida* que causam infecções em pacientes com neoplasia hematológica, sendo responsável por uma taxa de mortalidade superior a 80% (PFALLER; DIEKEMA, 2004). *Trichosporon asahii* foi a espécie predominantemente isolada em nosso estudo. Ela encontra-se amplamente distribuída no ambiente e um grande número das cepas estudadas é isolado de pacientes imunocomprometidos (KURTZMAN et al., 2011). Esta espécie é conhecida por causar infecções invasivas profundas, sendo isolada de tecidos pulmonares, sangue e urina de pacientes acometidos por essas infecções. A espécie é raramente isolada também da pele ou cabelo de pacientes com *piedra branca* (KURTZMAN et al., 2011). A suscetibilidade a anfotericina B é variável no gênero *Trichosporon* e esta droga possui baixa atividade para algumas espécies desse gênero. *T. asahii* foi reportado como multiresistente a anfotericina B e fluconazol em alguns casos, enquanto os novos triazóis estão sendo mais ativos contra essa espécie, de forma que o voriconazol está sendo bastante utilizado no tratamento de infecções por *T. asahii* (PFALLER; DIEKEMA, 2004).

Trichosporon coremiiforme, juntamente com *Candida carpophila*, foram as duas espécies com maior número de isolados (13,3% cada) em nosso estudo, após *T. asahii* (60%). *T. coremiiforme* é comumente encontrado no solo, porém algumas estirpes já foram isoladas de casas de pacientes com pneumonite de hipersensibilidade do verão japonês, de pacientes com lesões fúngicas na cabeça, abscesso subcutâneo e urina (KURTZMAN et al., 2011; CHAGAS-NETO et al., 2009). *T. coremiiforme* e *T. asahii* possuem semelhanças fisiológicas e morfológicas, apresentando células globóides ou ovóides e hifas septadas com artroconídeos

(figura 6a e 6b). Além disso, mostram grande similaridade genética (KURTZMAN et al., 2011).

O surgimento de técnicas moleculares mais avançadas tem resultado em alterações expressivas na classificação biológica, especialmente em micro-organismos. Assim, após muitos estudos que envolveram análises morfológicas, testes moleculares e eletrocariótipos de cepas relacionadas com *Candida guilliermondii*, determinou-se um novo clado composto por *Meyerozyma (Pichia) guilliermondii*, *Meyerozyma (Pichia) caribbica*, *Candida carpophila*, *Candida glucosophila*, *Candida athensensis*, *Candida smithsonii* e *Candida elateridarum* (KURTZMAN et al., 2011). No caso de *C. carpophila*, evidências demonstram que esta espécie está relacionada com insetos e plantas, já tendo sido isolada de vespas, frutos de *Ficus sp.*, troncos de árvores, de formigas e do solo (KURTZMAN et al., 2011). Não foi relatada até o momento alguma importância clínica para essa espécie, mas sabe-se que *C. guilliermondii* é associada à ocorrência de onicomicose, osteomielite e candidíase hematogênica disseminada (PFALLER; DIEKEMA, 2004) e, portanto, não se deve excluir a possibilidade de *C. carpophila* apresentar, em condições favoráveis, algum grau de patogenicidade. Microscopicamente, essa espécie possui células globóides a ovoides e podem aparecer sozinhas ou em pares (figura 6c) (KURTZMAN et al., 2011).

Galactomyces candidus (syn. *Geotrichum candidum*) é um fungo leveduriforme que apresenta muitas hifas, artroconídeos (figura 6d) e algumas vezes um odor de fruta característico. É normalmente isolado do solo, água, leite, ar, tecidos vegetais e trato digestivo de humanos e outros mamíferos. Esta espécie é muito utilizada na produção de alimentos, principalmente na maturação de queijos. Em relação à sua importância clínica é sabido que infecções ocasionadas por *G. candidus* já foram relatadas e são, principalmente, do tipo pulmonar e broncopulmonar, cutânea, oral e disseminada (KURTZMAN et al., 2011; POTTIER et al., 2008). Porém, segundo Pottier (2008) estes registros são muito raros, tendo sido relatados menos de 100 casos entre os anos de 1842 e 2006.

Cryptococcus laurentii possui células elipsoidais ou globosas (figura 6e) e sua colônia tem aspecto mucoide, brilhante e coloração variando de creme claro a ligeiramente salmão. Esta espécie é cosmopolita e já foi isolada de diversos ambientes como solo, água do mar, madeira em decomposição e a partir de fontes clínicas, já tendo sido encontrada em lesões pulmonares, fluido peritoneal, em pacientes de transplante de medula óssea com fungemia, em recém-nascidos, e em infecções da corrente sanguínea (KURTZMAN et al., 2011).

Assim, nota-se que todas as espécies encontradas em nosso estudo possuem representantes que já foram relatados em casos clínicos, permitindo-nos inferir que os ninhos de *Cyphomyrmex transversus* podem atuar como um reservatório natural de leveduras potencialmente patogênicas, o que torna esses insetos possíveis disseminadores desses micro-organismos.

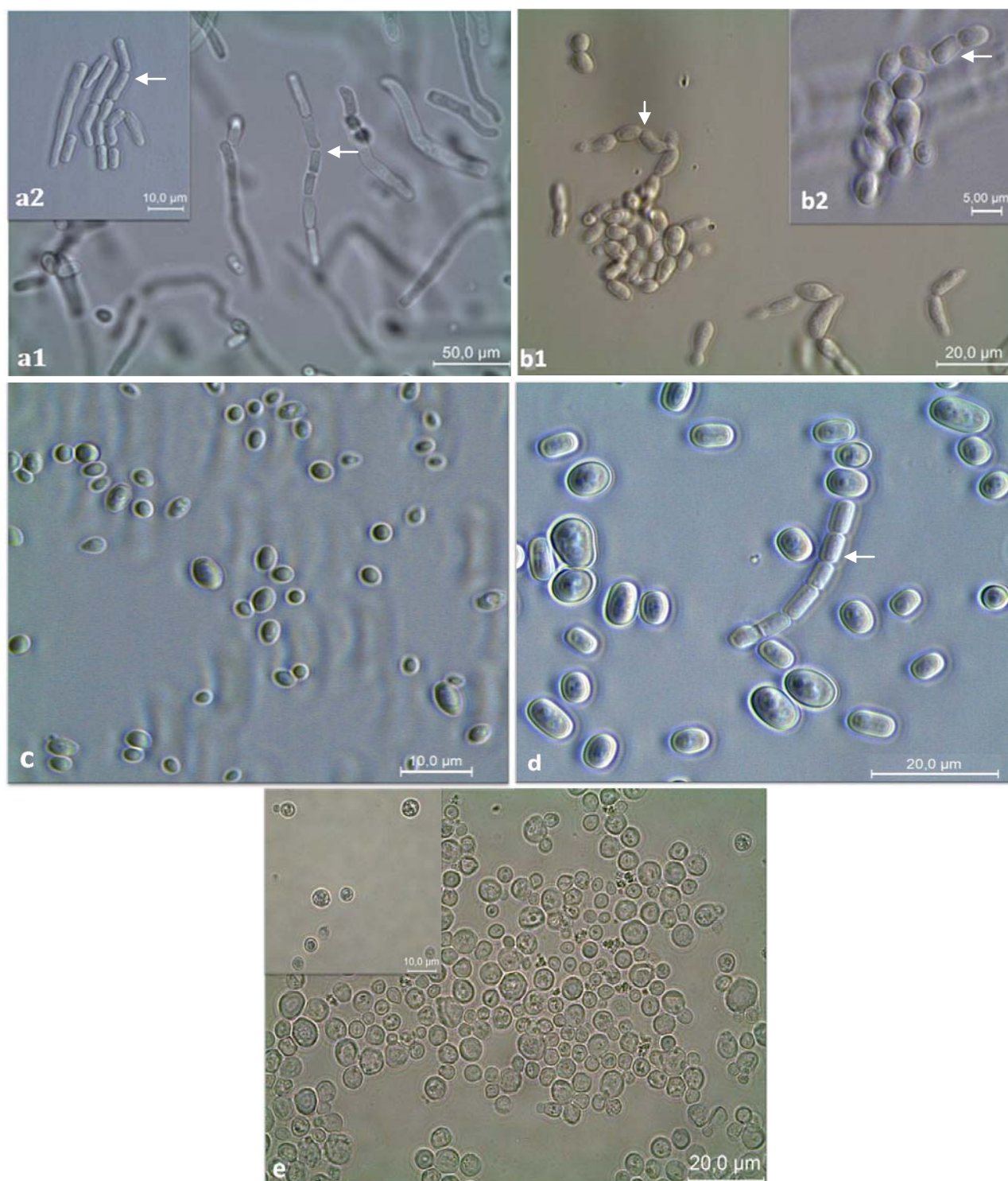


Figura 6 - análise microscópica, com contraste de fase, de *Trichosporon asahii* (a2), *Trichosporon coremiiforme* (b1 e b2), *Candida carpophila* (c) e *Galactomyces candidus* (d); análise microscópica, com campo claro, de *Trichosporon asahii* (a1) e *Cryptococcus laurentii* (e). As setas indicam as hifas septadas características do gênero *Trichosporon* e *Galactomyces*.

4.3 Teste de microdiluição para determinação da CIM

A etapa de identificação das estirpes é necessária para os testes de determinação da CIM, pois a classificação das estirpes em categorias de suscetibilidade (suscetível, suscetibilidade dose-dependente ou resistente) é possível apenas quando existem valores interpretativos, ou seja, quando esses valores já foram publicados para cada espécie ou gênero frente a cada antifúngico. Não existem valores específicos de *breakpoints* para as espécies ou gêneros presentes neste trabalho e, portanto, adotaram-se para as cinco espécies em questão os pontos de corte para *Candida*, da mesma forma que foi adotado por outros autores em estudos prévios (GUINEA et al., 2010; CHAGAS-NETO et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2004; PAPHITOU, 2002).

Os valores de CIM obtidos tanto nas duplicatas presentes na mesma placa quanto nos testes realizados para confirmação dos resultados foram semelhantes, sendo considerados apenas os valores com diferenças de uma diluição entre as duplicatas. Além disso, só foram considerados os resultados dos testes que apresentaram o crescimento esperado para as estirpes padrão *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Para *C. krusei*, esses valores ficaram entre 16mg/L a 32mg/L para fluconazol (a estirpe possui resistência intrínseca a este antifúngico), 0,25mg/L a 1mg/L para itraconazol, 0,5mg/L a 2mg/L para anfoterina B e 0,12mg/L a 0,5mg/L para o voriconazol. Para *C. parapsilosis* as faixas de CIMs determinaram valores de 0,5mg/L a 2mg/L para fluconazol, 0,12mg/L a 0,25mg/L para itraconazol, 1mg/L a 2mg/L para anfotericina B e 0,03mg/L a 0,12mg/L para voriconazol. Todos esses valores estão dentro das recomendações da norma M27-A2 (CLSI, 2002).

A leitura de 50% de inibição para antifúngicos fungistáticos se faz necessária para que os valores obtidos sejam mais confiáveis, uma vez que não atuam nas células já formadas que foram aplicadas no teste e estas podem acarretar em leituras de falsa resistência, através do fenômeno de *trailing*. O *trailing* é identificado quando há um aumento da CIM de 24 horas para 48 horas e o isolado que era classificado como “sensível” se torna “resistente” (CLSI, 2002).

Todas as leituras visuais realizadas determinaram valores de CIM similares aos do espectrofotômetro, apresentando diferença de uma diluição em 18 resultados distribuídos entre os três antifúngicos azólicos (19/90; 21%). Nestes casos, foram considerados os valores obtidos através do espectrofotômetro. No entanto, isto não se aplica aos resultados de anfotericina B, devido à leitura de 100% de inibição para este antifúngico possibilitar melhor visualização dos *breakpoints*.

Alguns resultados demonstraram diferença de uma diluição entre a leitura visual de 24h e 48h, sendo que a maioria não alterou a categoria de interpretação, ou seja, não resultou em uma mudança da classificação da estirpe de “sensível” para “resistente” (Tabela 1). Porém, três estirpes de *Trichosporon asahii* apresentaram um aumento no valor da CIM de 24h para 48h, frente à anfotericina B, o que possibilitou a classificação destes isolados como “resistente”. No entanto, não foi caracterizado como *trailing*, pois este é um fármaco de ação fungicida. O fato da anfotericina B apresentar uma tendência de aumento dos valores de CIM com o passar do tempo já foi descrito em estudos anteriores (DIEKEMA et al. 2009) e, portanto, reforça-se a orientação sobre a realização de leituras no menor tempo possível, desde que haja crescimento do isolado no controle-positivo, pois a droga pode perder sua atividade ao longo do tempo (CLSI, 2002).

Tabela 1 - Valores de CIM de quatro antifúngicos frente a cinco espécies de leveduras, com base em leitura visual, segundo período de incubação

Espécie (nº de isolados)	Período de incubação (h)	Faixa de CIM (mg/L)			
		Fluconazol	Voriconazol	Itraconazol	Anfotericina B
<i>T. asahii</i> (18)	24	0,5-1	0,015-0,03	0,06-0,25	0,5-2
	48	1-2	0,015-0,03	0,06-0,25	0,5-2
<i>T. coremiiforme</i> (4)	24	0,5-1	0,015-0,03	0,06-0,125	0,25-1
	48	0,5-2	0,015-0,06	0,06-0,25	0,5-1
<i>C. carpophila</i> (4)	24	0,5-1	0,03	0,125-0,25	0,25-0,5
	48	2-4	0,06-0,125	0,125-0,5	0,5-1
<i>G. candidus</i> (3)	24	8-16	0,06-0,125	0,25-0,5	1
	48	16	0,125-0,25	0,5	1-2
<i>C. laurentii</i> (1)	24	1	0,03	0,125	0,5
	48	1	0,06	0,25	0,5

Os valores de CIMs para cada espécie estão resumidos na Tabela 2. Nota-se que grande parte (7/18; 38,9%) dos isolados de *T. asahii* apresentaram pouca suscetibilidade à anfotericina B (CIM >1mg/L). Apesar de não existirem estudos suficientes que ajudem a determinar valores de interpretação (*breakpoints*) das CIMs para o gênero *Trichosporon*, a maioria dos estudos tem como base os *breakpoints* de *Candida*. Grande parte dos estudos realizados com *Trichosporon* foram desenvolvidos com cepas clínicas (CHAGAS-NETO et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2004; PAPHITOU, 2002) e apenas um, segundo literatura consultada, utilizou um isolado ambiental (LI et al., 2005). De acordo com a revisão de literatura, de fato, anfotericina B tem baixa eficácia frente ao gênero *Trichosporon*,

concordando com os dados obtidos (CHAGAS-NETO et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2004; LI et al., 2005).

Em relação ao itraconazol, a maioria dos isolados de *Trichosporon* apresentaram valores baixos de CIMs, porém seis *T. asahii* (6/18; 33,3%) e o isolado N12c3 de *T. coremiiforme* (1/4; 25%) demonstraram suscetibilidade dose-dependente (CIM=0,25mg/L), confirmando estudos prévios de Arikan e Hascelik (2002) e Paphitou et al. (2002). A suscetibilidade dose-dependente se caracteriza pela dependência de alcançar o nível sanguíneo máximo possível do paciente através de mudanças na concentração da droga para possibilitar sua absorção adequada e atingir altas concentrações plasmáticas do antifúngico, para que se obtenha uma resposta ótima (CLSI, 2002).

Em relação ao voriconazol, as CIMs encontradas frente aos isolados de *Trichosporon* foram muito baixas, o que está condizente com a maioria dos dados de literatura (CHAGAS-NETO et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2004; GUO et al., 2011), apesar de alguns relatos de resistência à este antifúngico aparecerem apresentando CIM>16mg/L (PAPHITOU, 2002). Para fluconazol, os isolados de *Trichosporon* foram altamente sensíveis, condizendo com alguns autores (CHAGAS-NETO et al., 2009; GUO et al., 2011) e confrontando com outros (WOLF, 2001 e PAPHITOU, 2002) que relataram valores de CIMs altos (CIM >16mg/L), indicando possível resistência de *T. asahii* contra esse antifúngico.

Candida carpophila está classificada dentro do novo clado de subdivisão de *C. guilliermondii* e segundo Medeiros et al. (2007), estas duas espécies são bioquimicamente indistinguíveis. Ainda não há estudos suficientes em relação ao perfil de suscetibilidade de *C. carpophila* frente aos antifúngicos testados neste trabalho e, portanto, será feita uma comparação aos valores existentes para *C. guilliermondii*. Sabe-se que *C. guilliermondii* é uma das espécies do gênero *Candida* que suscita grande preocupação quanto à possibilidade de resistência a diversos antifúngicos, tanto anfotericina B, quanto azólicos (PFALLER; DIEKEMA, 2003). Esta espécie é menos freqüente como agente de infecções invasivas e a literatura exhibe pouca informação sobre seu perfil de suscetibilidade. Os valores de CIMs dos isolados de *C. carpophila*, de modo geral, foram baixos principalmente em relação ao fluconazol e voriconazol. No entanto, duas estirpes (2/4; 50%) apresentaram CIM=1mg/L para anfotericina B, valor próximo da resistência (CIM>1mg/L) e três isolados (3/4; 75%) tiveram CIM=0,25mg/L frente ao itraconazol, caracterizando suscetibilidade dose-dependente. Quando comparado aos valores dos isolados clínicos de *C. guilliermondii* presentes na literatura (PFALLER; DIEKEMA, 2003), nota-se grande semelhança entre as

CIMs encontradas para *C. carpophila* no presente estudo, sendo que esta última se diferencia apenas por demonstrar maior suscetibilidade ao itraconazol. Apesar de termos isolado um baixo número de estirpes desta espécie, estes dados são importantes devido à escassez de informações literárias a respeito deste tipo de estudo com *C. carpophila*.

Cryptococcus laurentii é raramente agente da criptococose humana ou animal, ainda que seu encontro em ambiente natural seja frequente (FERREIRA-PAIM et al., 2011). Por este motivo, são raras as informações sobre a suscetibilidade dessa espécie aos antifúngicos usados na prática médica. Neste estudo, o único isolado foi sensível a todos os fármacos avaliados, se tomarmos em conta os *breakpoints* aplicados ao gênero *Candida*. Assim, considerando as diferenças na virulência e locais de infecção entre os dois gêneros, é muito prematuro fazer uma interpretação da significância clínica dos valores de CIM para este isolado. Em relação à espécie *Galactomyces candidus* (syn. *Geotrichum candidum*) foram encontradas poucas informações na literatura para comparação de dados, devido à existência de poucos casos de infecção por esse micro-organismo. Porém, nota-se que os três isolados apresentaram valores altos de CIMs para fluconazol, itraconazol e anfotericina B. Pottier et al. (2008), cita que alguns isolados clínicos de *Geotrichum candidum* foram resistentes a alguns azóis, incluindo fluconazol e itraconazol, e também para anfotericina B. Além disso, todas as espécies de *Geotrichum* ssp. testadas por Kucukates et al. (2005), apresentaram suscetibilidade dose-dependente (CIM=16-32mg/L) para fluconazol. Dessa forma, apesar das poucas informações existentes, os resultados das estirpes isoladas de ninhos de *Cyphomyrmex transversus* demonstraram valores de CIM similares aos de isolados clínicos descritos na literatura.

Tabela 2 - Distribuição dos valores de CIM (mg/L) de quatro antifúngicos frente a 30 estirpes de leveduras isoladas de ninhos de *Cyphomyrmex transversus*

Espécie	Agente antifúngico	CIM (mg/L)												
		0,015	0,03	0,06	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64
<i>T. asahii</i>	Anfotericina B	0	0	0	0	0	5	6	7	0	0	NT	NT	NT
<i>T. coremiiforme</i>		0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	NT	NT	NT
<i>C. carpophila</i>		0	0	0	0	0	2	2	0	0	0	NT	NT	NT
<i>G. candidus</i>		0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	NT	NT	NT
<i>C. laurentii</i>		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>T. asahii</i>	Fluconazol	NT	NT	NT	0	0	0	12	6	0	0	0	0	0
<i>T. coremiiforme</i>		NT	NT	NT	0	0	1	2	1	0	0	0	0	0
<i>C. carpophila</i>		NT	NT	NT	0	0	0	0	1	3	0	0	0	0
<i>G. candidus</i>		NT	NT	NT	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0
<i>C. laurentii</i>		NT	NT	NT	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>T. asahii</i>	Itraconazol	0	0	3	9	6	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>T. coremiiforme</i>		0	0	1	2	1	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>C. carpophila</i>		0	0	0	1	3	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>G. candidus</i>		0	0	0	0	3	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>C. laurentii</i>		0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>T. asahii</i>	Voriconazol	4	14	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>T. coremiiforme</i>		2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>C. carpophila</i>		0	1	1	2	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>G. candidus</i>		0	0	0	2	1	0	0	0	0	0	NT	NT	NT
<i>C. laurentii</i>		0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	NT	NT	NT

NT = não testado

A comparação da suscetibilidade das estirpes deste estudo segundo o gênero e a espécie, frente a dados de literatura, pode ser realizada segundo os parâmetros de intervalo, média geométrica, CIM₅₀ e CIM₉₀ dos valores da concentração inibitória mínima de anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol (Tabela 3). A comparação entre gêneros não é viável pelo número reduzido de estirpes dos gêneros *Candida*, *Galactomyces* e *Cryptococcus*, em relação às do gênero *Trichosporon*. Além disso, CIM₅₀ e CIM₉₀ só são aplicáveis acima de 10 estirpes (Informação pessoal fornecida pela Dra. Márcia Melhem – Instituto Adolf Lutz, Rio Claro) e, portanto, esses parâmetros só foram analisados para *T. asahii*. Assim, a discussão será feita com base em cada um desses gêneros.

Para anfotericina B, em estudo realizado com 43 isolados clínicos de *T. asahii*, Pfaller e Diekema (2004) encontraram valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ maiores (4 mg/L e 4 mg/L, respectivamente) do que os observados neste estudo (1 mg/L e 2 mg/L, respectivamente);

além disso, descreveu valor máximo de CIM igual a 8 mg/L, enquanto, neste estudo o maior valor encontrado foi 4 vezes menor (CIM=2 mg/L). No entanto, Chagas-Neto et al. (2009) realizaram estudos com 15 estirpes de *T. asahii*, e estas apresentaram média geométrica para anfotericina B (MG=1,14mg/L) bastante próximo ao valor encontrado no presente estudo (MG=1,12 mg/L). Para *T. coremiiforme*, ambos os estudos supracitados indicam valor máximo de CIM idêntico ao encontrado para as estirpes deste estudo, ou seja, 1 mg/L. Dessa forma, apesar desses valores terem sido obtidos a partir de estirpes isoladas do meio ambiente, confirmam observações prévias de estudos clínicos de que não são recomendados tratamentos com anfotericina B em pacientes na vigência de infecção por *Trichosporon* spp. (em particular *T. asahii*), especialmente, aqueles com alteração do sistema imunológico (LI et al., 2005; CHAGAS-NETO et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2004; PAPHITOU, 2002).

No entanto, nota-se que para *Candida carpophila* e *Cryptococcus laurentii* a anfotericina B mostrou melhores resultados. A faixa de CIM obtida para *C. carpophila* no presente estudo é semelhante a observada para *C. guilliermondii* por Pfaller e Diekema (2004), onde 90% dos isolados foram inibidos com 1mg/L. Há relatos de estirpes de *C. guilliermondii* resistentes à anfotericina B, porém de 102 isolados analisados no estudo de Pfaller e Diekema (2004), apenas 2 apresentaram resistência. O resultado do isolado de *C. laurentii* está de dentro da faixa de CIM descrita por Ferreira-Paim (2011) para 38 isolados ambientais desta mesma espécie. Portanto, este fármaco poliênico possuiu satisfatória ação fungicida para estes micro-organismos e é, de fato, um medicamento comumente utilizado para infecções invasivas de *Candida* e *Cryptococcus*. Para *G. candidus*, conforme observado, um isolado apresentou resistência à anfotericina B e, portanto, na clínica, a utilização deste antifúngico para o tratamento com esta estirpe possivelmente não seria a melhor opção.

Para fluconazol, os isolados de *Trichosporon asahii* apresentaram 1mg/L para ambos CIM₅₀ e CIM₉₀, indicando susceptibilidade de todas as estirpes. Os valores de CIM₅₀ e CIM₉₀ nos estudos clínicos de Pfaller e Diekema (2004) foram relativamente mais altos (2mg/L e 8 mg/L, respectivamente), o que pode ser explicado pela diferença do ambiente em que as estirpes foram isoladas, uma vez que, provavelmente, as leveduras isoladas dos ninhos de *Cyphomyrmex transversus* nunca tiveram contato com esta droga. Porém, em um segundo estudo clínico, a média geométrica dos valores de CIM após 48 horas de incubação foi 1,3mg/L para 15 isolados de *T. asahii* (Chagas-Neto et al., 2009), valor este muito próximo do obtido neste estudo (MG=1,26 mg/L). Para um isolado clínico de *T. coremiiforme*, Chagas-Neto et al. (2009) encontrou CIM de 1mg/L após 48 horas de incubação, valor este idêntico à média geométrica das CIMs dos quatro isolados que estão sendo estudados. *C. carpophila* e

C. laurentii também foram bastante suscetíveis a este antifúngico. Dessa forma, o fluconazol é um fármaco que apresentou forte ação fungistática contra as estirpes de *Trichosporon*, *C. carpophila* e *C. laurentii*. Porém, não demonstrou atividade inibitória expressiva para as estirpes de *G. candidus*, nos permitindo inferir que o fluconazol não seria um fármaco adequado para tratamentos de uma infecção por esse micro-organismo.

Com relação ao itraconazol foram observados valores baixos de CIM para *T. asahii*, apresentando CIM₅₀ e CIM₉₀ de 0,125 e 0,25mg/L, respectivamente. Portanto, apesar de seis estirpes terem apresentado CIM de 0,25mg/L (6/18; 33,3%), caracterizando suscetibilidade dose-dependente, todos os isolados foram suscetíveis. Com exceção de *C. laurentii*, todas as outras espécies apresentaram pelo menos um isolado que demonstrou CIM de 0,25mg/L para itraconazol, valor relativamente alto. Isto demonstra que o itraconazol não deve ser o fármaco de primeira escolha caso ocorra uma infecção com algum desses isolados.

Com relação aos antifúngicos azólicos, o voriconazol demonstrou a melhor atividade contra todas as estirpes. Os resultados mostraram que sua menor eficácia foi frente aos isolados de *G. candidus* e, no entanto, para *T. asahii* apresentou ambas CIM₅₀ e CIM₉₀ em 0,03mg/L e *T. coremiiforme* demonstrou média geométrica de 0,025 mg/L. Conforme já mencionado em estudos prévios com estirpes de isolados ambientais e clínicos (LI et al., 2005; CHAGAS-NETO et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2004), os novos triazólicos demonstram ser mais ativos contra as espécies do gênero *Trichosporon*, confirmando os dados obtidos. Dessa forma, observamos que este antifúngico fungistático poderia ser um fármaco de preferência para tratamentos clínicos de possíveis infecções com estas estirpes.

Tabela 3 - Suscetibilidade de 30 estirpes de leveduras isoladas de ninhos de *Cyphomyrmex transversus*, frente a quatro antifúngicos

Espécie (nº de isolados)	Agente antifúngico	CIM (mg/L)			
		Faixa de CIM	MG	CIM ₅₀	CIM ₉₀
<i>T. asahii</i> (18)	AMB	0,5 - 2	1,12	1	2
	FCZ	1 - 2	1,26	1	1
	ITZ	0,06 - 0,25	0,14	0,125	0,25
	VCZ	0,015 - 0,03	0,026	0,03	0,03
<i>T. coremiiforme</i> (4)	AMB	0,5 - 1	0,71	NA	NA
	FCZ	0,5 - 2	1	NA	NA
	ITZ	0,06 - 0,25	0,15	NA	NA
	VCZ	0,015 - 0,06	0,025	NA	NA
Total <i>Trichosporon</i> (22)	AMB	0,5 - 2	1	NA	NA
	FCZ	0,5 - 2	1,20	NA	NA
	ITZ	0,06 - 0,25	0,13	NA	NA
	VCZ	0,015 - 0,06	0,025	NA	NA
<i>C. carpophila</i> (4)	AMB	0,5 - 1	0,71	NA	NA
	FCZ	2 - 4	3,36	NA	NA
	ITZ	0,125 - 0,25	0,21	NA	NA
	VCZ	0,03 - 0,125	0,073	NA	NA
<i>G. candidus</i> (3)	AMB	1 - 2	1,26	NA	NA
	FCZ	8 - 16	12,7	NA	NA
	ITZ	0,25	0,25	NA	NA
	VCZ	0,125 - 0,25	0,16	NA	NA
<i>C. laurentii</i> (1)	AMB	0,5	-	NA	NA
	FCZ	1	-	NA	NA
	ITZ	0,25	-	NA	NA
	VCZ	0,03	-	NA	NA
Total (30)	AMB	0,5-2	0,95	-	-
	FCZ	0,5-16	1,74	-	-
	ITZ	0,06-0,25	0,15	-	-
	VCZ	0,015-0,25	0,036	-	-

CIM₅₀, valor da concentração inibitória mínima necessária para inibir 50% dos isoladosCIM₉₀, valor da concentração inibitória mínima necessária para inibir 90% dos isolados

NA, não aplicado para menos de 10 isolados

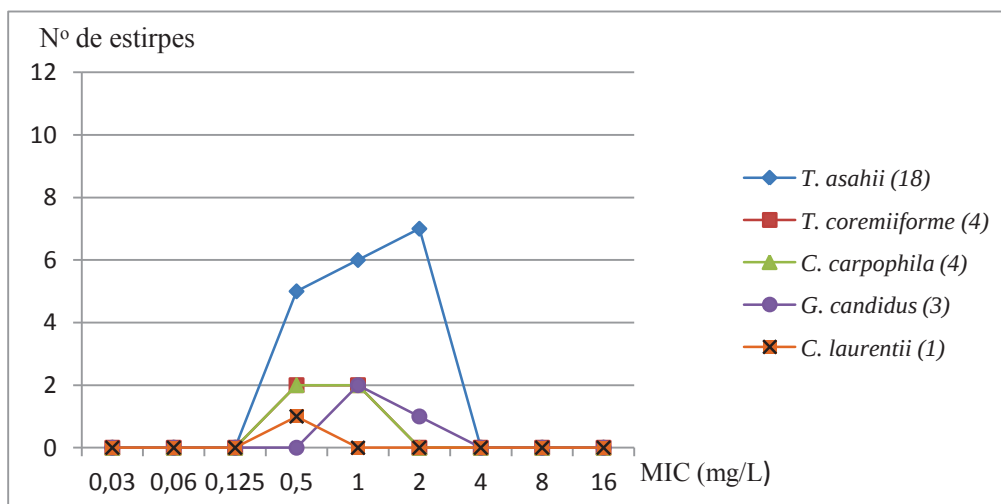
MG = Média geométrica

AMB = anfotericina B; FCZ = fluconazol; ITZ = itraconazol; VCZ = voriconazol

Os resultados detalhados de todas as leituras (visuais e em espectrofotômetro), segundo cada isolado frente aos quatro antifúngicos se encontram no Apêndice A (Tabela 4).

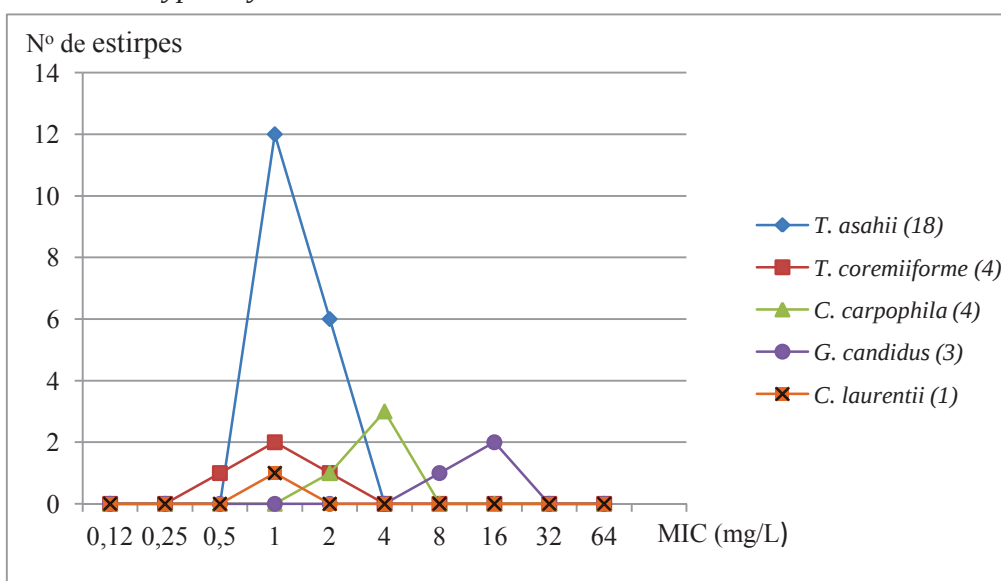
As figuras 7, 8, 9 e 10 permitem uma ampla visualização dos resultados obtidos para as 30 estirpes frente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol e voriconazol, respectivamente.

Figura 7 - Susceptibilidade (CIM, mg/L) de 30 leveduras isoladas de oito ninhos de *Cyphomyrmex transversus* frente à anfotericina B



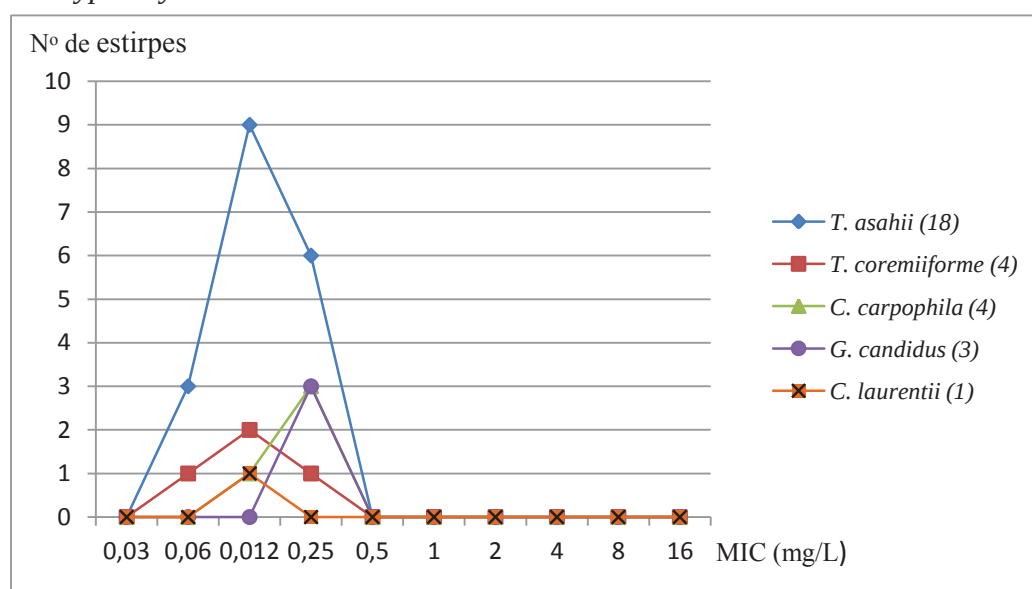
Na figura 7, observa-se que o pico da linha correspondente ao *T. asahii* é mais alto e mais deslocado para a direita do gráfico, devido ao número de estirpes (7) que apresentaram resistência ao fármaco (CIM=2mg/L). Além disso, *T. coremiiforme* e *C. carpophila* apresentaram os mesmos resultados para as quatro estirpes e, portanto, as linhas de ambos se encontram em sobreposição. Nota-se ainda, a queda parcial da linha corresponde a *G. candidus* após 1 mg/L, devido à presença de uma estirpe dessa espécie que também apresentou resistência.

Figura 8 - Susceptibilidade (CIM, mg/L) de 30 leveduras isoladas de oito ninhos de *Cyphomyrmex transversus* frente ao fluconazol



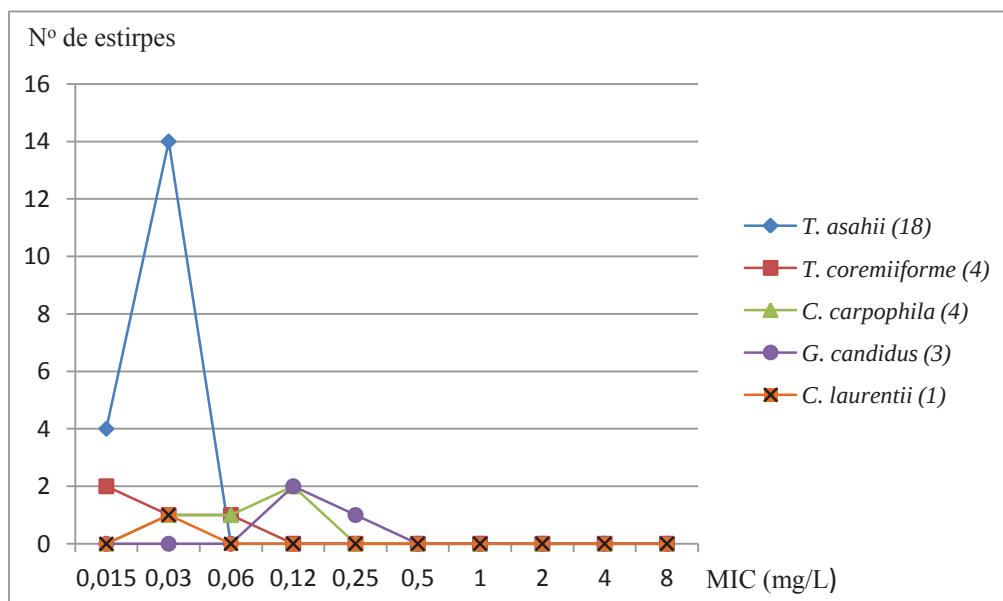
Na figura 8, o gráfico mostra apenas a linha correspondente ao *G. candidus* deslocada para a direita e com seu pico em 16 mg/L, permitindo a visualização de que apenas estas estirpes apresentaram um perfil de maior resistência ao fluconazol. *C. carpophila* também mostrou um gráfico levemente deslocado para a direita, devido às suas 3 estirpes com CIM de 4 mg/L. Porém, este valor ainda corresponde a uma significativa suscetibilidade ao fármaco. Todas as outras linhas se encontram deslocadas para o lado esquerdo do gráfico, demonstrando alta susceptibilidade de todas as outras espécies frente a este antifúngico. O elevado pico de *T. asahii* corresponde ao grande número de isolados (12) que tiveram CIM=1 mg/L.

Figura 9 - Susceptibilidade (CIM, mg/L) de 30 leveduras isoladas de oito ninhos de *Cyphomyrmex transversus* frente ao itraconazol



Considerando valores de CIM ≥ 1 mg/L como resistente para itraconazol, o gráfico permite clara visualização de que este antifúngico obteve boa atividade fungistática para todas as estirpes. Porém, é notável que *G. candidus* e *C. carpophila* possuem o pico mais deslocado para a direita, correspondente à CIM de 0,25 mg/L (suscetibilidade dose-dependente) para a maioria de suas estirpes.

Figura 10 - Susceptibilidade (CIM, mg/L) de 30 leveduras isoladas de oito ninhos de *Cyphomyrmex transversus* frente ao voriconazol



Para voriconazol é notável que ocorreram inibições de algumas estirpes de *Trichosporon* na menor concentração do antifúngico. Além disso, todas as espécies tiveram alta suscetibilidade a este antifúngico, pois nenhuma delas chegou próximo ao valor de resistência (4 mg/L). Desta forma, o gráfico permite fácil conclusão de que o voriconazol apresentou forte atividade fungistática.

Testes estatísticos para verificação de variabilidade significativa não foi realizado, pois entre espécies do mesmo gênero (*Trichosporon ssp.*) os valores foram nitidamente muito próximos e a comparação entre espécies diferentes podem ficar inviáveis devido à grande diferença de número de isolados.

5 CONCLUSÃO

Neste trabalho, as 30 estirpes isoladas dos ninhos de *Cyphomyrmex transversus* foram identificadas e todas possuem representantes da mesma espécie ou filogeneticamente próximos de espécies que já foram isolados de casos clínicos. Portanto, pode-se afirmar que os ninhos dessa espécie de formiga podem servir como um reservatório natural de leveduras potencialmente patogênicas, como já observadas com outras espécies da mesma tribo Attini (PAGNOCCA et al., 2010).

A partir da comparação entre os resultados das CIMs para as 30 estirpes estudadas e os dados da literatura com isolados clínicos, observou-se que em muitos casos os valores foram semelhantes, causando significativa preocupação, devido ao fato de que em ambiente natural esses microrganismos nunca tiveram contato com agentes antifúngicos.

As estirpes de *Galactomyces candidus* despertam especial preocupação, pois demonstraram tendência à resistência para ambos antifúngicos fungicida e fungistático, caracterizando multirresistência.

Dessa forma, o contato dessa espécie de formiga com humanos ou ambientes urbanos possui riscos de disseminação de micro-organismos potencialmente patogênicos, incluindo estirpes que podem ser de difícil controle terapêutico, caso ocorra uma possível infecção, principalmente em indivíduos imunocomprometidos.

REFERÊNCIAS

- ARIKAN, S.; HASCELIK, G. Comparison of NCCLS microdilution method and Etest in antifungal susceptibility testing of clinical *Trichosporon asahii* isolates. **Diagnostic Microbiology and infectious disease**, Ankara, v. 43, n. 2, p. 107-111, 2002.
- BRANDÃO, C. R. F.; MAYHÉ-NUNES, A. J. A new fungus-growing ant genus, *Mycetagroicus* gen. n., with the description of three new species and comments on the monophyly of the Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Sociobiology**, Chico, v. 38, n. 3, p. 639-665, 2001.
- CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of actions in yeast cells. **Revista Española de quimioterapia**, Bilbao, v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.
- CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; MELO, A. S. A.; COLOMBO, A. L. Bloodstream infections due to *Trichosporon* ssp.: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. **Journal of clinical microbiology**, São Paulo, v. 47, n. 4, p. 1074-1081, 2009.
- DIEKEMA, D.J.; MESSER, S.A.; BOYKEN, L.B.; HOLLIS, R.J.; KROEGER J.; TENDOLKAR, S.; PFALLER, M.A. In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. **Journal of Clinical Microbiology**, Iowa, v. 4, n. 10, p. 3170-3177, 2009.
- FERREIRA-PAIM, K.; ANDRADE-SILVA, L.; MORA, D. J.; LAGES-SILVA, E.; PEDROSA, A. L.; DA SILVA, P. R.; ANDRADE, A. A.; SILVA-VERGARA, M. L. Antifungal susceptibility, enzymatic activity, PCR-Fingerprinting and ITS sequencing of environmental *Cryptococcus laurentii* isolates from Uberaba, Minas Gerais, Brazil. **Mycopathologia**, v. 174, p. 41-52, 2011.
- GUINEA J.; RECIO S.; ESCRIBANO P.; TORRES-NARBONA M.; PELÁEZ T.; SÁNCHEZ-CARRILLO C.; RODRÍGUEZ-CRÉIXEMS M.; BOUZA E. Rapid antifungal susceptibility determination for yeast isolates by use of Etest performed directly on blood samples from patients with fungemia. **Journal of Clinical Microbiology**, Madrid, v.48, n. 6, p. 2205-2212, 2010.
- GUO, L.-A.; XIAO, M.; KONG, F. CHEN, S. C.-A.; WANG, H.; SORREL, T. C.; JIANG, W.; DOU, H.-T., LI, R.-Y.; XU, Y.-C. Three-Locus identification, genotyping, and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. **Journal of clinical microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3805- 3811, 2011.
- KLINGENBERG, C.; BRANDÃO, C.R.F. Revision of the fungus-growing ant genera *Mycetophylax* Emery and *Paramycetophylax* Kusnezov rev. stat., and description of *Kalathomyrmex* n. gen. (Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Zootaxa**, Auckland, v. 2052, n. 3, p. 1-31, 2009.

KUCUKATES, E.; ERTURAN, Z.; SUSEVER, S.; YEGENOGLU, Y. In vitro susceptibility of yeasts isolated from patients in intensive care units to fluconazole and amphotericin B during 3-year period. **Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica**, v. 113, n. 4, p. 278-283, 2005.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts, a taxonomic study**. 15. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.3v.

KURTZMAN, C. P.; ROBNETT, C. J. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 73, n. 4, p. 331-371, mai. 1998.

LACAU, L. de S. R. **Bioecologia comparada de duas espécies de *Cyphomyrmex* Mayr (formicidae: Myrmicinae)**. 2006. 294 f. Parte dos requisitos para a obtenção do título de douto em ciências biológicas. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2006.

LI, H.-M.; DU, H.-T.; LIU, W.; WAN, Z.; LI, R.-Y. Microbiological characteristics of medically important *Trichosporon* species. **Mycopathologia**. Beijing, v. 160, p. 217-225, 2005.

MAYHÉ-NUNES, A. J.; JAFFÉ, K. On the biogeography of Attini (Hymenoptera: Formicidae). **Ecotropicos**, Mérida, v. 11, n. 1, p. 45-54, 1998.

MEDEIROS, E. A. S.; LOTT, T. J.; COLOMBO, A. L.; GODOY, P.; COUTINHO, A. P.; BRAGA, M. S.; NUCCI, M.; BRANDT, M. E. Evidence for a pseudo-outbreak of *Candida guilliermondii* fungemia in a university hospital in Brazil. **Journal of clinical microbiology**, v. 45, n. 3, p. 942-947, 2007.

MEHDIABADI, N. J.; MUELLER, U. G.; BRADY, S. G.; HIMLER, A. G.; SCHULTZ, T. R. Symbiont fidelity and the origin of species in fungus-growing ants. **Nature communications**, v. 3, n. 840, 2012.

MEHDIABADI, N. J.; SCHULTZ, T. R. Natural history and phylogeny of the fungus-farming ants (Hymenoptera: Formicidae: Myrmicinae: Attini). **Myrmecological news**, Vienna, v. 13, p. 37-55, abr. 2010.

MEYER, W.; MITCHELL, T. G.; FREEDMAN, E. Z.; VILGALYS, R. Hybridization probes for conventional DNA fingerprinting used as single primers in the polymerase chain reaction to distinguish strains of *Cryptococcus neoformans*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 31, n. 39, p. 2274-2280, set. 1993.

MOREIRA, M. I. M. C. G. **Azóis: farmacologia interações medicamentosas**. 2010. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em licenciatura no curso de ciências farmacêuticas) – Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada M27-a2**. 2. ed. Wayne, 2002.

NOBRE, M. de O.; NASCENTE, P. da SILVA; MEIRELES, M. C.; FERREIRO, L. Drogas antifúngicas para pequenos e grandes animais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 32, n. 1, p. 175-184, 2002.

ODDS, F. C.; BROWN, A. J. P.; GOW, N. A. R. Antifungal agents: Mechanism of action. **TRENDS in Microbiology**, Aberdeen, v.11, n. 6, p. 272-279, 2003.

PAGNOCCA, F.C.; RODRIGUES, A.; BACCI JR., M. Microrganismos associados às formigas cortadeiras. In: LUCIA, T. M. C. D. (Ed.). **Formigas Cortadeiras: da biotecnologia ao manejo**. Viçosa: Ed. UFV, 2011. p. 262-283.

PAPHITOU, N. I.; OSTROSKI-ZEICHNER; PAETZNICK, V. L.; RODRIGUEZ, J. R.; CHEN, E.; REX, J. H. In vitro antifungal susceptibilities of *Trichosporon* species. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Houston, v. 46, n. 4, p. 1144-1146, 2002.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N.; International Fungal Surveillance Participant Group. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and four licensed systemic antifungal agents against *Candida* species infrequently isolated from blood. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 1, p. 78-83, 2003.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Rare and Emerging opportunistic fungal pathogens: concert for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. **Journal of Clinical Microbiology**, Iowa, v. 42, n. 10, p. 4419-4431, 2004.

POTTIER, I.; GENTE, S.; VERNOUX, J.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: *Geotrichum candidum*. **International journal of food microbiology**. Caen, v. 126, n. 3, p. 327-332, 2008.

SAMPAIO, J. P.; GADANHO, M.; SANTOS, S.; DUARTE, F. L.; PAIS, C.; FONSECA, A.; FELL, J. W. Polyphasic taxonomy of the basidiomycetous yeast genus *Rhodosporeidium*: *Rhodosporeidium kratochilovae* and related anamorphic species. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 51, n. 2, p. 687-697, mar. 2001.

SCHULTZ, T. R.; MEIER, R. A phylogenetic analysis of the fungus-growing ants (Hymenoptera:Formicidae: Attini) based on morphological characters of the larvae. **Systematic Entomology**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 337-370, 1995.

TASSO, L. **Modelagem farmacocinética – farmacodinâmica das fluorquinolonas levofloxacino e gatifloxacino**. 2008. 119 f. Tese para a obtenção do título de douto em ciências farmacêuticas. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005.

WEBER, N. A. Fungus-growing ants. **Science**, Washington, v. 153, n. 3763, p. 587-604, 1966.

WEBER, N. A. Gardening ants: The Attines. **Philadelphia: American Philosophical Society**, v. 92, p.146, 1972.

WOLF, D. G., FALK, R.; HACHAM, M.; THEELEN, B.; BOEKHOUT, T.; SCORZETTI, G.; SHAPIRO, M.; BLOCK, C.; SALKIN, I. F.; POLACHECK, I. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. **Journal of clinical microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4420-4425, 2001.

APÊNDICE A – RESULTADOS DETALHADOS

Tabela 4 - Resultados de CIMs a partir de leituras visuais (24 horas e 48 horas) e em espectrofotômetro (48 horas) para 30 estirpes isoladas de ninhos de *Cyphomyrmex transversus*

Código	Espécie	CIM (mg/L)											
		VISUAL AMB		VISUAL ITZ		VISUAL FCZ		VISUAL VCZ		ESPECTRO AMB		ESPECTRO ITZ	
		24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h	48h	48h	48h	48h
N2g	<i>Trichosporon asahii</i>	2	2	0,125	0,125	1	2	0,015	0,03	2	2	0,125	1
N3a	<i>Trichosporon asahii</i>	0,5	2	0,25	0,25	1	1	0,015	0,015	2	2	0,25	1
N3b	<i>Trichosporon asahii</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	1	1	0,015	0,03	0,5	0,5	0,125	1
N3c	<i>Trichosporon asahii</i>	0,5	1	0,25	0,25	1	1	0,015	0,015	1	1	0,25	1
N3d	<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	0,125	0,125	1	1	0,015	0,015	1	1	0,125	1
N3e	<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	0,125	0,125	0,5	1	0,015	0,03	1	1	0,125	1
N3f	<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	0,06	0,125	0,5	1	0,015	0,03	1	1	0,125	1
N3g	<i>Trichosporon asahii</i>	2	2	0,125	0,125	0,5	1	0,015	0,03	2	2	0,125	1
N4ap	<i>Trichosporon asahii</i>	2	2	0,06	0,06	1	2	0,015	0,03	2	2	0,06	2
N4ap2	<i>Trichosporon asahii</i>	1	2	0,125	0,125	1	2	0,015	0,03	2	2	0,125	2
N5a	<i>Trichosporon asahii</i>	0,5	0,5	0,06	0,06	1	1	0,015	0,015	0,5	0,5	0,06	2
N5c	<i>Trichosporon asahii</i>	0,5	0,5	0,06	0,06	1	1	0,015	0,015	0,5	0,5	0,06	1
N5d-1	<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	0,125	0,125	1	1	0,015	0,015	1	1	0,25	1
N6K1	<i>Trichosporon asahii</i>	2	2	0,125	0,25	1	1	0,03	0,03	2	2	0,125	2
N6K2	<i>Trichosporon asahii</i>	1	2	0,125	0,25	2	2	0,03	0,03	2	2	0,25	1
N6K3	<i>Trichosporon asahii</i>	1	1	0,125	0,125	1	1	0,015	0,03	1	1	0,125	1
N6K5	<i>Trichosporon asahii</i>	0,5	0,5	0,125	0,125	1	2	0,015	0,03	0,5	0,5	0,25	2
N12a2	<i>Trichosporon asahii</i>	0,5	0,5	0,25	0,25	1	2	0,015	0,015	0,5	0,5	0,25	2
N12a1	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1	1	0,125	0,125	0,5	0,5	0,015	0,015	1	1	0,125	1
N12c1	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	1	1	0,125	0,25	0,5	0,5	0,015	0,015	1	1	0,125	0,5
N12c3	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	0,5	1	0,015	0,03	0,5	0,5	0,25	1
N12d2	<i>Trichosporon coremiiforme</i>	0,25	0,5	0,06	0,06	1	2	0,03	0,06	0,5	0,5	0,06	2
N4af	<i>Galactomyces candidus</i>	1	2	0,25	0,5	8	16	0,06	0,25	2	2	0,25	16
N4cf	<i>Galactomyces candidus</i>	1	1	0,25	0,5	16	16	0,06	0,125	1	1	0,25	16
N4df	<i>Galactomyces candidus</i>	1	1	0,25	0,5	8	16	0,125	0,125	1	1	0,25	8
N6b1	<i>Candida guilliermondii</i>	1	1	0,125	0,125	0,5	2	0,015	0,03	1	1	0,125	2
N8a	<i>Candida guilliermondii</i>	0,25	0,5	0,125	0,25	1	4	0,03	0,125	0,5	0,5	0,25	4
N8b	<i>Candida guilliermondii</i>	0,25	0,5	0,125	0,25	1	2	0,03	0,125	0,5	0,5	0,25	4
N16a	<i>Candida guilliermondii</i>	0,5	1	0,25	0,25	1	4	0,015	0,125	1	1	0,25	4
N12d	<i>Cryptococcus laurentii</i>	0,5	0,5	0,125	0,25	1	1	0,03	0,06	0,5	0,5	0,125	1

ANEXO A – CONSTITUINTES DO MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Tabela 5 - Constituintes do *Sabouraud dextrose Agar* (Acumedia)

Componentes	Quantidade (em g/L)
Digerido enzimático de caseína	5
Digerido enzimático de tecido animal	5
Dextrose	40
Ágar	15
Água destilada	1000 mL

Tabela 6 - Constituintes do CHROMágar® *Candida* (Difco)

Componentes	Quantidade (em g/L)
Chromopeptona	10,2
Glicose	20,0
Chromogen Mix	2,0
Chloranfenicol	0,5
Agar	15,0

Tabela 7 - Constituintes do meio RPMI-1640 (com glutamina e vermelho de fenol, mas sem bicarbonato)

Componente	g/L de água	Componente	g/L de água
L-arginina	0,200	Biotina	0,0002
L-asparagina	0,050	D-pantotenico	0,00025
L-aspártico, ácido	0,020	Colina, cloreto de	0,003
L-cistina . 2HCl	0,0652	Ácido fólico	0,001
L-glutâmico, ácido	0,020	Mioinositol	0,035
L-glutamina	0,300	Niacinamida	0,001
Glicina	0,010	PABA	0,001
L-histidina	0,015	Piridoxina HCl	0,001
L-hidroxiprolina	0,020	Riboflavina	0,0002
L-isoleucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B ₁₂	0,000005
L-lisina . HCl	0,040	Nitrato de cálcio x H ₂ O	0,100
L-metionina	0,015	Cloreto de potássio	0,400
L-fenilalanina	0,015	Sulfato de magnésio	0,04884
L-prolina	0,020	Cloreto de sódio	6,000
L-serina	0,030	Fosfato de sódio, dibásico	0,800
L-treonina	0,020	D-glicose	2,000
L-triptofano	0,005	Glutathione, reduzida	0,001
L-tirosina . 2Na	0,02883	Vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

Lídia de Azevedo Duarte
Aluna

Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca
Orientador