


---

CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

---

**DANIELA TURA DE ALMEIDA**

**Avaliação da atividade de antifúngicos contra  
leveduras isoladas de ninhos da formiga  
*Acromyrmex balzani***



Rio Claro  
2015

DANIELA TURA DE ALMEIDA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE ANTIFÚNGICOS CONTRA  
LEVEDURAS ISOLADAS DE NINHOS DE FORMIGAS *Acromyrmex balzani*

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 Bacharela e Licenciada em Ciências Biológicas.

Rio Claro  
2015

576 Almeida, Daniela Tura de  
A447a Avaliação da atividade de antifúngicos contra leveduras  
isoladas de ninhos de formigas *Acromyrmex balzani* / Daniela  
Tura de Almeida. - Rio Claro, 2015  
47 f. : il., figs., gráfs., tabs., fots.

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

1. Micro-organismos. 2. Leveduras oportunistas. 3.  
Resistência. I. Título.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais e melhores amigos, Joana e Marco, por todo apoio, amor e base sólida que me ofereceram ao longo da minha vida, pelo caráter e valores que me transmitiram fazendo-me ser quem sou hoje e por todos os esforços que fizeram, possibilitando meus estudos e me proporcionando a oportunidade de chegar até aqui, sempre ao meu lado em minhas decisões. À toda minha família, em especial ao meu tio Marco Antônio, por sua amizade e carinho e por toda ajuda e apoio que me deu ao longo desses anos de graduação me possibilitando essa conquista. A minha irmã Cecília pelos anos de companheirismo e amizade durante toda minha vida e por sempre estar presente durante esses cinco anos, me dando muita força. À minha avó Maria, por ter me transmitido muita sabedoria e contribuir muito para a pessoa que sou hoje, por todo amor e carinho de sempre. E aos meus primos, Daniel, Isabela, Pedro, Fernando e Thaísa por toda amizade e amor.

Ao meu namorado, parceiro e melhor amigo, Rodolfo, por todo amor, apoio, incentivo, paciência e cuidado oferecidos durante todos esses anos. Por me guiar quando me faltavam forças e direção e por sempre estar ao meu lado nessa caminhada, me ajudando em minhas decisões e ouvindo meus desabafos. Obrigada por ser quem é e ser toda a força que eu preciso muitas vezes.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca, pela confiança depositada em mim durante esses anos, pelo conhecimento transmitido contribuindo para minha formação como profissional e pela amizade. À Profª. Dra. Márcia Melhem, que com grande paciência sempre foi muito solícita quando precisei de sua ajuda para aprender os conceitos fundamentais do trabalho, me recepcionando no Instituto Adolfo Lutz, sempre com muita disposição e bom humor. À Lídia que me ensinou muito a respeito desse trabalho, compartilhando todo seu conhecimento e experiência.

Agradeço à todos do Laboratório de Microbiologia do Centro de Estudos de Insetos Sociais, Virgínia, Ana Paula, Ifê, Caio, Silvio, Samuel pelos bons momentos dentro do laboratório, pela disponibilidade e prontidão em sempre ajudar e ensinar, e pela amizade. Em especial à Paixão, por toda atenção, paciência e disposição que teve comigo ao longo desses anos, contribuindo em grande parte para minha construção como profissional, pela amizade verdadeira, apoio e companheirismo que me ofereceu desde o início e por seu bom humor que fez de todos os momentos no laboratório muito melhores. Às minhas amigas Daiane e à Maria, por todo carinho e companheirismo e por tornarem o ambiente de trabalho leve e alegre com a presença de vocês. E à Noemi, por ter me indicado e me avisado sobre essa

oportunidade e também por todos seus conselhos e amizade. Agradeço também ao Prof. Dr. Mário Palma, por disponibilizar parte de seu laboratório para que eu pudesse executar meus experimentos, à Bibiana, por sua disposição em ajudar em algumas metodologias desse trabalho. À Fran, pela paciência que teve comigo quando as leituras precisaram ir até mais tarde, me auxiliando muitas vezes e principalmente por toda amizade e carinho.

Aos meus amigos, primeiramente à família CBN10 por terem feito dessa jornada a melhor possível, por toda parceria e momentos inesquecíveis que vivenciamos nesses anos todos, um agradecimento especial à Fernanda, ao Caio (Xe) e as minhas queridas amigas-irmãs Ayumi e Natani por todo o amor, cuidado, carinho e dedicação que tiveram comigo durante essa caminhada, sendo muitas vezes o motivo de eu nunca me sentir sozinha.

À minha amiga-irmã Amanda, por ter me recebido quando cheguei em Rio Claro com todo seu carinho e atenção, tornando a nova experiência e todas as mudanças muito menos difíceis e por estar sempre presente, por todo cuidado, amor, apoio e parceria ao longo de todos esses anos. Às minhas queridas amigas Alci e Dands pela parceria e amizade e ótimos momentos já vividos.

Aos amigos de São Paulo, em especial à Camila Brasil, Juliana, Flávia, Suzana, Lyz, Fernanda, Natália, Camilinha, Big e Léo por todos esses anos de amizade, por terem sempre se mantido presentes, o que me deu sempre muita força estando longe e por todos os momentos incríveis que já vivenciamos. Aos amigos de Mogi Mirim, em especial à Janete, Fernandão, Vó Júlia, Laurinha, Luís, Lud, Buck, Amandinha, Vasco, Rô, Thaís e Renan pelo carinho, parceria e amizade.

À todo pessoal Bio Logus Jr., por todas as experiências e sonhos compartilhados, por todos os ótimos momentos, apoio e amizade e por contribuírem em meu crescimento pessoal e profissional.

Ao CNPq pelo financiamento dessa pesquisa.

Enfim, a todos que possibilitaram, direta ou indiretamente, a realização deste trabalho, meu MUITO OBRIGADA!

**“A vida é o que fazemos dela. As viagens são os viajantes. O que vemos não é o que vemos, senão o que somos.”**

Fernando Pessoa

## RESUMO

Ao longo das últimas décadas, a frequência de micoses oportunistas e invasoras tem aumentado significativamente e atingem principalmente indivíduos imunocomprometidos. As leveduras estão entre os mais importantes fungos causadores de doenças. Os testes para análise da sensibilidade de leveduras aos antifúngicos são amplamente utilizados, especialmente na clínica médica; porém, o conhecimento sobre a ocorrência de resistência aos antifúngicos, principalmente para isolados de ambientes naturais ainda são escassos. A tribo Attini possui cerca de 230 espécies de formigas e todas possuem o hábito de cultivar e se alimentar de fungos. Neste trabalho isolamos 50 leveduras de ninhos das formigas *Acromyrmex balzani* da região de Palmas (TO) e analisamos a suscetibilidade aos seguintes antifúngicos: anfotericina B, fluconazol, voriconazol, posaconazol, itraconazol e caspofungina. A caracterização dos isolados foi feita através de métodos morfológicos e moleculares, incluindo 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. *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*. Os isolados foram identificados como: *Candida albicans* (9), *Candida cellae* (4), *Candida infanticola* (2), *Candida tropicalis* (3), *Brettanomyces naardenensis* (2), *Cryptococcus* sp. (1), *Kasachstania unispora* (2), *Meyerozyma caribbica* (10), *Meyerozyma guilliermondii* (3), *Trichosporon asahii* (7), *Trichosporon loubieri* (1) e *Trichosporon mycotoxinivorans* (6). Dos 50 isolados testados, 68% (29) apresentaram alguma forma de não suscetibilidade à pelo menos um antifúngico. Dois isolados de *C. albicans* (4%) e os seis isolados de *T. mycotoxinivorans* (12%) apresentaram resistência a anfotericina B. Também houve a ocorrência de dose-dependência em 15 isolados (30%) em relação ao itraconazol, em um isolado (2%) de *M. caribbica* em relação ao fluconazol e nove isolados (18%) do gênero *Trichosporon* foram não sensíveis a caspofungina. Considerando que os ninhos das formigas podem abrigar algumas espécies patogênicas e resistentes a alguns dos antifúngicos mais utilizados, estudos adicionais devem ser realizados para ampliar o conhecimento em relação ao potencial de disseminação desses micro-organismos por esses insetos.

Palavras-chave: Antifúngicos, Leveduras oportunistas. Resistência.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1</b>	<b>Agentes antifúngicos</b> .....	<b>8</b>
<b>1.1.1</b>	<b>Anfotericina B</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1.2</b>	<b>Azóis</b> .....	<b>10</b>
<b>1.1.3</b>	<b>Equinocandinas</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2</b>	<b>Leveduras e as Formigas Attini</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	<b>17</b>
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1</b>	<b>Coleta e isolamento das leveduras</b> .....	<b>18</b>
<b>3.2</b>	<b>Identificação das leveduras</b> .....	<b>19</b>
<b>3.3</b>	<b>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Preparação dos agentes antifúngicos e do meio RPMI</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Preparação do cultivo de 24h</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.3</b>	<b>Preparação das microplacas e realização dos testes</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3.4</b>	<b>Leitura e análise dos resultados</b> .....	<b>22</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>24</b>
<b>4.1</b>	<b>Identificação dos isolados</b> .....	<b>24</b>
<b>4.2</b>	<b>Teste de microdiluição para determinação da CIM</b> .....	<b>27</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>37</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>38</b>
	<b>APÊNDICE A</b> .....	<b>43</b>
	<b>APÊNDICE B</b> .....	<b>43</b>
	<b>ANEXO A – CONSTITUINTES DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS</b> .....	<b>44</b>
	<b>ANEXO B – PREPARAÇÃO DAS MICROPLACAS</b> .....	<b>46</b>



## 1 INTRODUÇÃO

Ao longo das últimas décadas, a frequência de micoses oportunistas e invasoras tem aumentado significativamente (PFALLER et al., 2006). Dentre as aproximadamente 100.000 espécies de fungos já conhecidas, calcula-se que aproximadamente duzentas espécies sejam patogênicas e que cerca de cinquenta delas estão regularmente associadas com micoses (COOPER, 2011).

As leveduras estão entre os mais importantes fungos causadores de doenças, incluindo oportunistas bem conhecidos como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, causadores da candidíase e da criptococose, respectivamente. A maior parte dos agentes patogênicos são membros do gênero *Candida* e, em uma escala menor, também são encontradas leveduras dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia*, *Trichosporon*, *Rhodotorula*, *Sporobolomyces* e *Ustilago*, dentre outros (PFALLER e DIEKEMA, 2004; COOPER, 2011).

Algumas espécies de *Candida* estabelecem uma relação de comensalismo com o homem, estando presentes em condições normais no trato gastrointestinal e tecidos cutâneos. No entanto, elas podem se reproduzir em taxas mais elevadas quando o hospedeiro está imunocomprometido como no caso de pacientes portadores de HIV, por exemplo. Pacientes submetidos a transplantes de órgãos, idosos e recém-nascidos, também são mais comumente afetados por candidíases (KURTZMAN et al., 2011; PFALLER; DIEKEMA, 2004; CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Aumento da frequência de infecções por fungos oportunistas vem sendo observado (PFALLER; DIEKEMA, 2004), o que fez com que crescesse também o número de pesquisas para a descoberta de novos antifúngicos dotados de amplo espectro de atividade (ODDS et al., 2003) e também de baixa ou nenhuma toxicidade ao hospedeiro (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

Os testes para análise da sensibilidade das leveduras aos antifúngicos são muito úteis em âmbito clínico e são amplamente utilizados, porém, apesar do avanço desses testes, os dados quanto à suscetibilidade aos antifúngicos ainda são escassos (REVANKAR et al., 1998; DUARTE et al., 2012), principalmente para isolados de ambientes naturais. Apesar da existência de poucos dados, tem se constatado nas últimas décadas um aumento da resistência desses organismos aos agentes antifúngicos (DUARTE et al., 2012; DIEKEMA et al., 2009), o que ressalta a importância de mais estudos.

As leveduras utilizadas neste trabalho foram previamente isoladas do material de descarte e do jardim de fungos dos ninhos de *Acromyrmex balzani*, por meio da técnica de flotação em óleo mineral e foram obtidas da Central de Recursos Microbianos da UNESP.

### 1.1 Agentes antifúngicos

Os diferentes tipos de micoses tornaram-se um importante problema de saúde pública, pois a incidência dessas doenças tem aumentado muito em indivíduos imunocomprometidos (transplantados, portadores de HIV) e também devido à utilização de terapias com imunossupressores que vem aumentando desde a década de 70 (CARRILLO-MUNÓZ et al.; 2006; GHANNOUM et al.; 1999; ODDS et al., 2003).

A terapia atual para micoses invasivas utiliza um número relativamente reduzido de medicamentos antifúngicos e, os mais usados são: anfotericina B, fluconazol e itraconazol. Alguns novos antifúngicos de famílias químicas antigas e novas, como voriconazol, posaconazol, ravuconazol, caspofungina e micafungina, também vem sendo introduzidos para tratamentos de infecções fúngicas (CARRILLO-MUNÓZ et al.; 2006).

O reduzido número de agentes antifúngicos utilizados na prática médica e veterinária se deve a necessidade dos mesmos não serem tóxicos ao hospedeiro, combinado com amplo espectro de atividade (CARRILLO-MUNÓZ et al., 2006). Porém, micro-organismos eucariotos, como é o caso das leveduras, utilizam processos metabólicos semelhantes para sintetizar suas proteínas e ácidos nucleicos, tornando-se mais difícil encontrar um ponto de toxicidade seletiva, que afete apenas o fungo. (TORTORA et al., 2005). Isso limita muito a gama de fármacos disponíveis, o que acarreta em um aumento significativo de cepas resistentes a elas, dificultando ainda mais os tratamentos. Essa resistência vem sendo observada desde a década de 90, porém, antes disso não se dava a devida importância a patógenos causadores de doenças fúngicas e dessa maneira, os estudos da resistência desses patógenos aos antifúngicos, são relativamente recentes (GHANNOUM et al.; 1999).

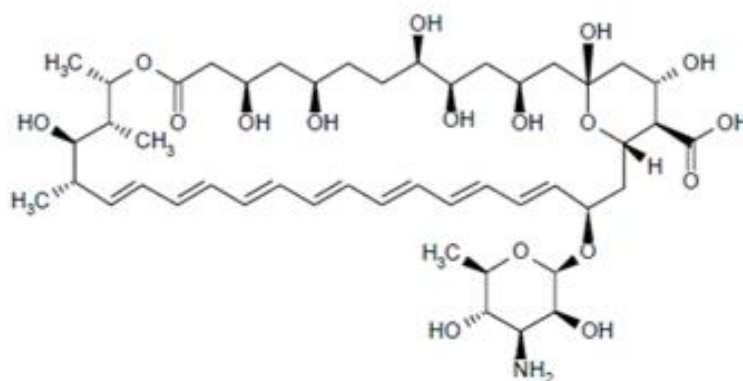
A anfotericina B, conhecida por causar nefrotoxicidade significativa, foi por muito tempo o único fármaco disponível para tratamento de infecções fúngicas (GHANNOUM et al.; 1999). Atualmente a anfotericina B e o fluconazol são os principais medicamentos utilizados para o tratamento de fungemia (GUINEA et al., 2010). Os azóis e outras famílias de fármacos estão sendo usados até com mais frequência para tratamento de candidemia e criptococose. No entanto, a baixa suscetibilidade emergente de fungos patógenos a derivados

de azol, como o fluconazol ou cetoconazol, ampliou interesses de pesquisa para outros compostos químicos com melhor atuação microbiológica (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

As diferentes classes de antifúngicos possuem modos de ação distintos, tendo alvos específicos de atuação nas células dos fungos. Esses locais de ação dos fármacos antifúngicos podem ser: (i) a parede celular no caso das equinocandinas; (ii) a membrana plasmática com os polienos e azóis; (iii) a síntese de DNA e RNA no caso da flucitosina; (iv) a síntese de proteínas com o uso de sordarina; (v) a formação de microtúbulos com a griseofulvina. Os antifúngicos mais utilizados são aqueles que atuam na membrana plasmática, afetando sua permeabilidade ao acarretar a formação de poros quando se ligam em seu ergosterol (ODDS et al., 2003). O ergosterol é o principal componente da membrana celular dos fungos e sua função essencial é de biorregulador da fluidez da membrana e também garantir a assimetria e integridade desta (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Esse composto é um dos principais alvos dos antifúngicos por ser um importante ponto de toxicidade seletiva, já que o principal esterol da membrana plasmática de mamíferos é o colesterol (TORTORA et al., 2005).

### 1.1.1 Anfotericina B

A anfotericina B (figura 1) é o fármaco de primeira escolha para diversos tratamentos de infecções fúngicas e faz parte do grupo dos polienos, caracterizados 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). Seu modo de ação na célula se baseia na ligação hidrofóbica de oito moléculas de anfotericina B ao ergosteol da membrana celular, o que acarreta na formação de poros que alteram a permeabilidade desta, o que resultará na morte da célula fúngica (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Porém, este antifúngico pode ocasionar toxicidade ao hospedeiro, pois ele possui uma baixa capacidade de diferenciar o ergosterol da membrana dos fungos do colesterol da membrana dos mamíferos, no entanto, isolados resistentes a este antifúngico raramente são encontrados nos pacientes (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006).

**Figura 1** – Estrutura da anfotericina B

Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006)

### 1.1.2 Azóis

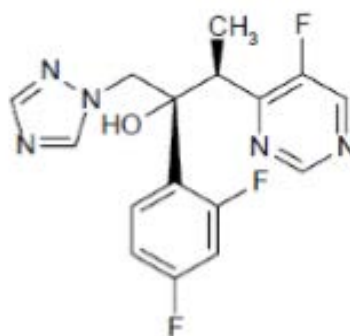
A primeira geração destas fármacos antifúngicos foram os imidazóis N-substituídos, que surgiram no final da década de 1960. Posteriormente surgiram os triazóis (fluconazol e itraconazol) e os novos derivados dos triazóis (voriconazol, ravuconazol, posaconazol e albaconazol) (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). A aprovação dos imidazóis e dos triazóis no final dos anos 1980 e início de 1990 foi um grande avanço da capacidade de tratar com segurança e eficácia infecções fúngicas sistêmicas (GHANNOUM et al., 1999). A primeira geração desses antifúngicos, os imidazóis, inibiam diversas enzimas e também a biossíntese de lipídios da membrana. Entretanto, as enzimas inibidas também realizam a biossíntese de colesterol nas células hepáticas dos mamíferos, causando sérios efeitos adversos ao paciente. Em contrapartida, os triazóis são menos tóxicos, pois apresentam um alvo de maior especificidade (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006). Devido a maior segurança, os triazóis, em particular, o fluconazol, passaram a ser amplamente utilizados (GHANNOUM et al., 1999).

Os triazóis inibem a enzima 14-alfa-desmetilase do lanosterol do citocromo P-450, que está relacionada com a biossíntese do ergosterol. Esta enzima é codificada pelo gene ERG11 e mutações desse gene podem conferir resistência ao antifúngico (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 inibição dos azóis 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).

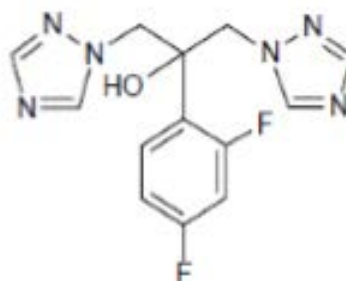
**Figura 2** – Estrutura do voriconazol



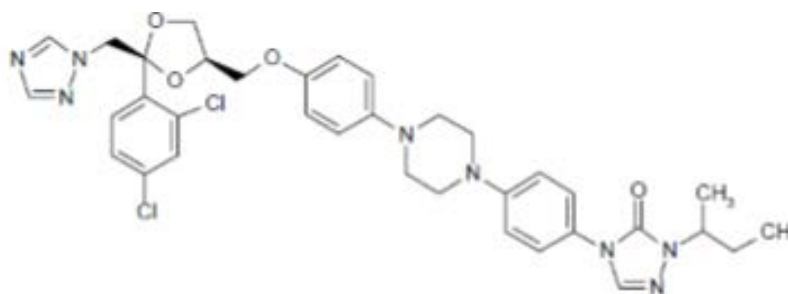
Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006)

Os triazóis fluconazol (figura 3) e itraconazol (figura 4) 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** – Estrutura do fluconazol

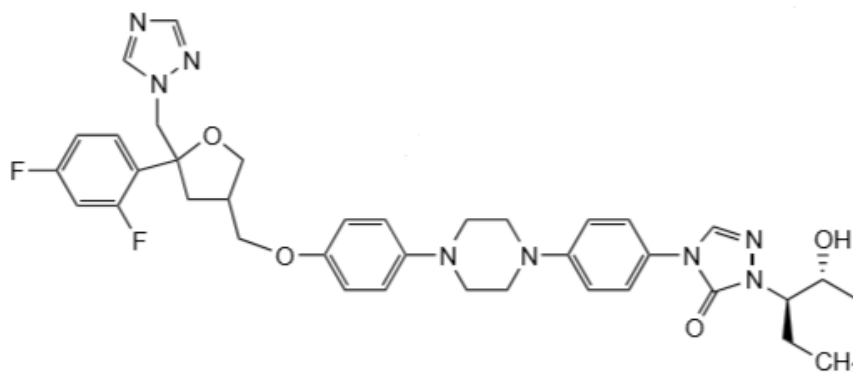


Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006)

**Figura 4** – Estrutura do itraconazol

Fonte: CARRILO-MUÑOZ, A. J. (2006)

O derivado dos triazóis posaconazol (figura 5) é mais semelhante ao itraconazol, porém possui o anel dioxolano alterado para um tetra. Embora, as diferenças estruturais possam parecer pequenas, elas ditam a potência antifúngica e o espectro de ação destes. O posaconazol também atua contra um amplo espectro de fungos sensíveis, e, curiosamente, mostra promissora eficácia contra micoses em estudos pré-clínicos (ODDS et al., 2003).

**Figura 5** – Estrutura do posaconazol

Fonte: ODDS, F. C. (2003)

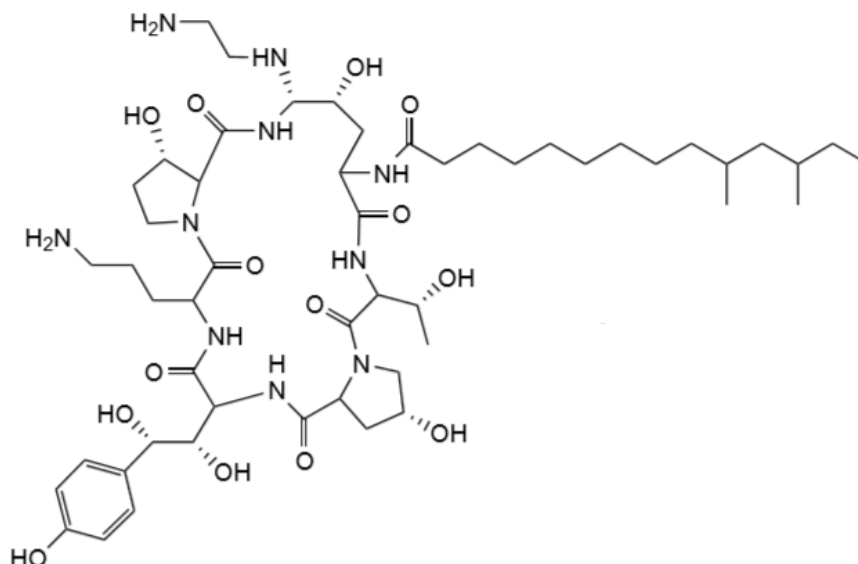
### 1.1.3 Equinocandinas

Descobertas em 1970, as equinocandinas são metabólitos secundários de fungos e apresentam um núcleo de hexapeptídeo cíclico com uma cadeia lateral de lípidos responsável pela atividade antifúngica. No final de 1990, três compostos da classe das equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) entraram em desenvolvimento clínico. O alvo desses fármacos é um complexo de proteínas responsável pela síntese da parede celular de  $\beta$ -

1,3 polissacarídeos glucano, porém maiores detalhes do mecanismo desse mecanismo de ação ainda não são muito conhecidos. A classe das equinocandinas representa um avanço particularmente interessante para a terapia antifúngica por possuir um alvo diferente dos outros antifúngicos. Por essa razão, existe o interesse dos clínicos em explorar a terapia de combinação de equinocandinas e azóis (ODDS et al., 2003).

A caspofungina foi aprovada pelo Agência Federal de Drogas dos EUA em 2001 para a terapia de aspergiloses. Entre os fungos patogênicos comuns, apenas *Cryptococcus neoformans* é excluído do espectro das equinocandinas e até agora, a resistência à caspofungina só apareceu por mutação do gene FKS1 em *C. albicans* (ODDS et al., 2003).

**Figura 6** – Estrutura da caspofungina



Fonte: ODDS, F. C. (2003)

## 1.2 Leveduras e as Formigas Attini

As leveduras são fungos que na maior parte de seu ciclo de vida se apresentam de forma unicelular ou em pequenos arranjos de células. Elas estão amplamente distribuídas por todos os biomas do mundo, sendo principalmente decompositoras e consideradas colonizadoras iniciais de substratos ricos em açúcar. Elas podem ser encontradas em abundância na filosfera, em níveis superiores da atmosfera, nas partes mais profundas dos oceanos, em aquíferos e até mesmo no gelo (KURTZMAN et al., 2011). Existem diversos estudos de leveduras isoladas do meio ambiente, como por exemplo, no trabalho de Roth et al., (1962) que foram encontradas em águas e sedimentos dos oceanos e mares do Atlântico, ou também encontradas no solo da Antártica (Connell et al., 2010). Além de decompositoras, as leveduras podem ter diversas funções no ambiente, podendo apresentar diversas relações com outros organismos, como: mutualismo, competição, parasitismo ou patogenicidade (KURTZMAN et al., 2011). Existem diversos estudos mostrando essas associações com animais, onde leveduras foram isoladas de vespas e formigas, por exemplo (STRATFORD et al., 2002; PAGNOCCA et al., 2011). Algumas espécies do gênero *Candida* são constantemente associadas ao homem, geralmente na forma de comensalismo. Entretanto, algumas delas podem se tornar patogênicas, especialmente quando em condições de baixa imunidade do hospedeiro, como mostram os estudos de (CARRILLO-MUÑOZ et al., 2006; PFALLER; DIEKEMA, 2004).

O jardim onde se encontra o fungo mutualista das formigas abriga uma grande quantidade e variedade de micro-organismos, incluindo leveduras. Espécies de *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* são comumente encontradas nesse nicho (PAGNOCCA et al.; 2010). É sabido que algumas das espécies encontradas nesses gêneros são causadoras de doenças fúngicas graves (KURTZMAN et al., 2011).

A maioria das infecções causadas por leveduras são devidas ao gênero *Candida* (PFALLER et al.; 2009), com predominância das espécies, *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. guilliermondii*, entre outras (KURTZMAN et al., 2011). Porém existem outras leveduras consideradas patogênicas distribuídas em outros gêneros como *Cryptococcus neoformans* ou oportunistas como *Saccharomyces*, *Trichosporon* e *Rhodotorula* (PFALLER et al.; 2009).



O maior grupo de agentes patogênicos é o dos ascomicetos, onde, além de *Candida*, encontram-se, em uma escala muito menor, representantes dos gêneros *Saccharomyces*, *Pichia* e *Magnusiomyces*. No grupo dos basidiomicetos os principais gêneros patogênicos são *Cryptococcus* e *Malassezia*. Outros gêneros causadores de doenças, dentro deste grupo são, *Sporobolomyces*, *Rhodotorula*, *Trichosporon* e *Ustilago* (KURTZMAN et al., 2011).

*Trichosporon* é o gênero de leveduras mais comum, depois de *Candida*, que está relacionado a infecções em pacientes com neoplasias hematológicas, sendo responsável por uma taxa de mortalidade superior a 80% (PFALLER; DIEKEMA, 2004).

Muitos autores já relataram a presença de leveduras em ninhos de formigas da tribo Attini (PAGNOCCA et al., 2010; CARREIRO et al., 1997.; PAGNOCCA et al., 1996.). Esta tribo é composta por 15 gêneros e aproximadamente 230 espécies (SCHULTZ; MEIER, 1995; KLINGENBERG; BRANDÃO, 2009) As formigas da tribo Attini cultivam fungos dentro de seus ninhos e estabelecem com eles uma relação de mutualismo, onde estas dependem deste fungo para obter alimento e em troca, fornecem alimentação, dispersão e proteção contra patógenos e competidores (MEHDIABADI; SCHULTZ, 2010). Elas se dividem em cinco sistemas de cultura que se caracterizam pela relação filogenética entre as formigas, o fungo cultivado e seus patógenos.

*Acromyrmex* é um gênero de formigas Attini que possui ampla distribuição geográfica, ocorrendo em quase todo o continente americano, (MARICONI, 1970). No Brasil, ocorre em todos os Estados e territórios continentais (DELLA LUCIA, 1993). Essas cortadeiras vêm chamando atenção crescentemente devido ao estrago que causam nas lavouras (DIEHL; CAVALLIMOLINA; ARAUJO, 2002).

A espécie *Acromyrmex balzani* nidifica em locais abertos, ensolarados e em solos de pouca umidade (ANDRADE, 1991), apresentando ninhos caracterizados por uma torre construída de fragmentos de palhas e outros resíduos vegetais que os protegem (apêndice B). Nas proximidades das torres encontram-se montículos de terra de forma semicircular e ao lado, o lixo trazido do interior dos ninhos (SILVA et al., 2010). Pimenta et al. (2007) verificaram que os ninhos dessa formiga apresentam quatro ou cinco câmaras, sempre superpostas, com profundidade máxima de 95,0 cm.

Conforme mencionado anteriormente, a presença de leveduras dentro desses ninhos de *Acromyrmex balzani* ocorre em abundância, podendo se dispersar através dessas formigas. Este fato é preocupante, pois muitas dessas espécies de leveduras encontradas estão relacionadas a patologias. Estudos envolvendo a resistência de espécies patogênicas isoladas desse tipo de ambientes ainda são escassos. No entanto, são de grande importância, já que

essas espécies provavelmente nunca tiveram contato com nenhuma desses fármacos anteriormente e se apresentarem resistência a elas, esta será natural, por essa razão essas leveduras foram objeto de estudo desse trabalho.

## 2 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivos:

1. Identificar as leveduras isoladas de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani*;
2. Avaliar a susceptibilidade de leveduras isoladas de ninhos da formiga cortadeira *Acromyrmex balzani* a diferentes antifúngicos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

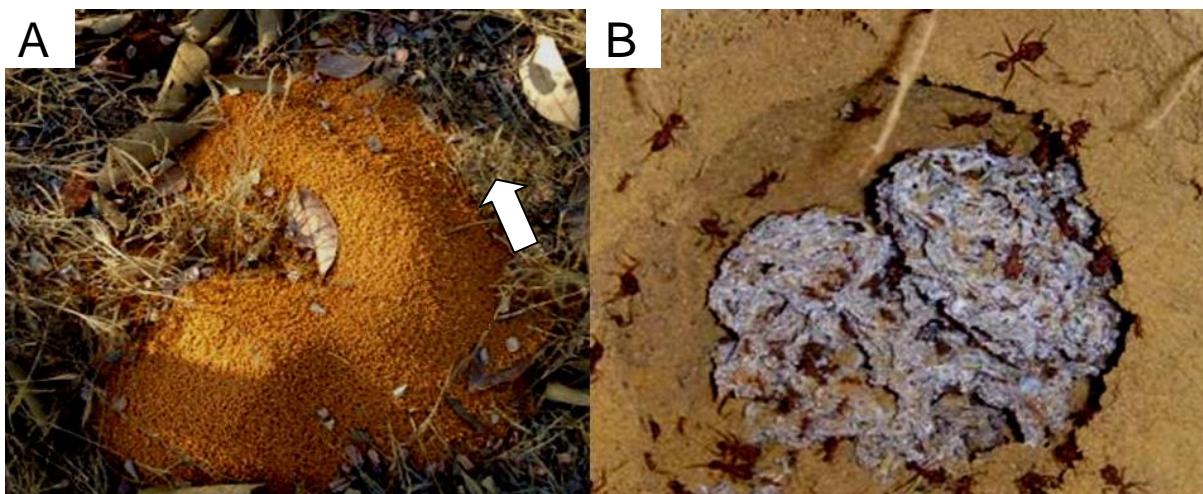
#### 3.1 Coleta e isolamento das leveduras

As 50 leveduras utilizadas neste trabalho estão depositadas na Central de Recursos Microbianos da-Unesp, Rio Claro e foram previamente coletadas pela Dra Weilan Gomes da Paixão Melo.

As leveduras foram isoladas do jardim de fungo (figura 7B) e do material de descarte (lixo) (figura 7A) de ninhos de formigas *A. balzani*, em três coletas realizadas no Estado do Tocantins, em julho de 2010 e em janeiro e agosto de 2011. Para o isolamento foi empregada a técnica de flotação em óleo mineral (SATOW, 2008). Para tanto, 1g do jardim de fungo ou do material de descarte dos ninhos foi colocada dentro de um tubo Falcon de 50 mL contendo 15mL de solução salina NaCl 0,85% esterilizada e antibióticos, nas seguintes concentrações: 200 U/mL de penicilina; 200µg/mL de cloranfenicol; 200 µg/mL de estreptomicina e 500 µg/mL de cicloheximida. Após repouso durante 30 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 1,0mL de óleo mineral esterilizado e realizou-se agitação vigorosa por 5 minutos em vórtex. O material foi novamente colocado em repouso por 20 minutos e incubado durante 30 dias e após esse período foram transferidas para ágar Mycosel e incubadas a 35°C, para obtenção de culturas puras. Os isolados foram e estocados a -80°C em glicerol 10%.

Foram isoladas 19 leveduras na primeira coleta, outras 36 na segunda coleta e mais 37 na terceira coleta.

**Figura 7** – Características dos ninhos de *A. balzani*



Fotos: Weilan G. da P. Melo

**Figura 3** - **A** - Ninho de *A. balzani* com material de descarte indicado pela seta. **B** - Jardim de fungo em ninho de *A. balzani*

### 3.2 Identificação das leveduras

Primeiramente as leveduras estocadas foram reativadas em meio Sabouraud dextrose ágar (Anexo A – Tabela 3), e incubadas a 25°C por 48 horas. Inicialmente os isolados foram agrupados utilizando métodos fenotípicos tradicionais (YARROW, 1998) e técnicas de Biologia Molecular, incluindo MSP-PCR para a análise de bandas comparativa e posterior sequenciamento de regiões específicas do rDNA (KURTZMAN, ROBNETT, 1998).

Para as extrações de DNA seguiu-se o protocolo modificado de Sampaio et al. (2001) e Almeida (2005) misturando-se 500µL de solução de lise, esferas de vidro e cerca de duas alçadas cheias de levedura em tubo “ependorf” de 2,0 mL,. O tubo foi agitado em vórtex por 4 minutos e colocado em banho-maria por 1h a 65°C. Após centrifugação por 15 minutos a 13.000 rpm, foi recuperada a fase aquosa com o DNA bruto, o qual foi armazenado a -20°C.

Foi realizado o sequenciamento dos domínios D1/D2 do rDNA. Para a amplificação do DNA foram utilizados os primers *forward* NL1 (5’GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG3’) e *reverse* NL4 (5’GGTCCGTGTTTCAAGACGG3’). O resultado 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. As amostras foram aplicadas no sequenciador ABI 3500, e as sequências obtidas foram editadas e alinhadas no programa *BioEdit Sequence Alignment Editor*. A sequência consenso obtida foi comparada com os dados do BLASTN do *National Center for Biotechnology Information-Genbank* (NCBI- GenBank) e do *Fungal Biodiversity Centre* (CBS-KNAW). As sequências com mais de 98% de similaridade com as apresentadas nas bases de dados foram consideradas como sendo da mesma espécie.

### **3.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

A CIM é definida como a menor concentração de um agente antimicrobiano que inibe o crescimento do micro-organismo em teste e foi determinada por métodos de microdiluição em microplacas de 96 poços, de acordo com a norma M27- A2 (CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI), 2002).

#### **3.3.1 Preparação dos agentes antifúngicos e do meio RPMI**

A Anfotericina B (Sigma®), o Itraconazol (Sigma®), o Voriconazol (Sigma®), e o Posaconazol (Sigma®) foram preparados a partir de diluições em dimetilsulfóxido (DMSO). O Fluconazol (Sigma®) e a Caspofungina (Sigma®) foram diluídos em água deionizada esterilizada. Foram preparadas “soluções estoque” com concentração de 64 µg/ml para o fluconazol e 16 µg/ml para os outros cinco antifúngicos, que foram mantidas em freezer - 80°C, conforme recomendado pela norma CLSI (2002), para não haver perda da atividade. Todas as diluições foram realizadas em meio RPMI-1640 (Sigma®) (com glutamina e sem bicarbonato). A preparação deste meio RPMI (Anexo A – Tabela 5) foi realizada de acordo com a norma M27-A2 (CLSI, 2002), sendo diluído nas concentrações recomendadas. Adicionou-se 34,53g de tampão MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico) 0,165M.

Em seguida, o pH foi ajustado para 7,0. Após o ajuste do pH, o meio foi esterilizado por filtração à vácuo e o frasco foi embrulhado em papel alumínio devido à fotossensibilidade do meio. O meio assim preparado foi armazenado em geladeira a 4°C .

### 3.3.2 Preparação do cultivo de 24h

Para os ensaios de CIM, as linhagens foram cultivadas em CHROM agar, *Candida* (Difco®) (Anexo A – Tabela 4), para verificar a pureza. Posteriormente, os isolados foram cultivados em meio Sabouraud Dextrose Ágar e incubados a 25°C por 24 horas, para então serem utilizados nos testes.

### 3.3.3 Preparação das microplacas e realização dos testes

A preparação das microplacas foi realizada da seguinte maneira: foram colocados 10µL de antifúngico na primeira coluna da microplaca, nas concentrações de 128µg/mL para o fluconazol e a caspofungina e 32µg/mL para o restante. Três linhas da placa foram utilizadas por isolado para obtenção dos resultados em triplicatas. Na primeira coluna adicionou-se 190µL do meio RPMI-1640, homogeneizando-se o antifúngico já presente. Em seguida, em todas outras colunas adicionou-se 100 µL de meio. Transferiu-se então, 100µL da primeira coluna para os poços da próxima coluna e assim sucessivamente, para se obter uma concentração decrescente do antifúngico. A última linha da placa é reservada para o controle do inóculo, onde são adicionados 200 µL de meio na linha H com as colunas 1,2 e 3 e 100 µL da suspensão celular em 100 µL de meio RPMI-1640 na linha H com as colunas 10,11 e 12. A partir da cultura de 24h em Sabouraud dextrose Agar, foi preparada uma suspensão celular em 1,5mL de solução salina 0,85% (p/v). A turbidez foi ajustada para 0,5 da escala de McFarland, que corresponde a uma suspensão-padrão de levedura com concentração de fator  $10^6$  células/mL. Pipetou-se 300µL dessa diluição em 30 mL de meio RPMI-1640, para obtenção de uma concentração celular de  $10^3$  células/mL. A preparação das microplacas pode ser melhor observada no Anexo B. As cepas-padrão *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019, foram utilizadas como controle de qualidade dos testes. Os valores das faixas de CIM esperadas pelas duas cepas controle são obtidos a partir da Norma M27-A2. Todas as placas foram incubadas a 35°C, em estufa com temperatura controlada, durante 48h.

### 3.3.4 Leitura e análise dos resultados

Para analisar os resultados foram realizadas leituras visuais e em espectrofotômetro Amersham Biosciences, modelo Biotrak II com leitor de microplaca, utilizando filtro de 450nm. No caso da anfotericina B, por ser um fármaco fungicida, a determinação da CIM foi feita em 100% de inibição, ou seja, onde não se observa nenhum crescimento da levedura. No caso dos fármacos fungistáticos, os azóis e a caspofungina, a CIM foi determinada no ponto onde se observou 50% de inibição.

A leitura da microplaca no espectrofotômetro foi realizada para confirmar a leitura visual e é importante principalmente para a análise dos resultados dos fármacos fungistáticos, pois a determinação visual para 50% do crescimento possibilita maior chance de erro. Assim leitura de absorbância de 50% de inibição se faz necessária para que os valores obtidos sejam mais confiáveis, uma vez que os antifúngicos fungistáticos 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”. Quando isso ocorre, devem ser considerados os resultados de 24 horas (CLSI, 2002).

A CIM, no caso dos fármacos fungistáticos, foi determinada pelo valor de absorbância mais próximo da metade do valor do controle do inóculo. No caso da anfotericina B, a determinação foi feita a partir do primeiro poço em que o valor se aproximar de zero. Os resultados das duas leituras foram comparados ao final, para confirmação dos pontos de corte. Todos os resultados de leitura visual foram confirmados pelas leituras em espectrofotômetro. Foram feitas triplicatas em todos os testes e para análise dos resultados foram considerados os resultados similares em até uma diluição de diferença entre as triplicatas.

A classificação em categorias de suscetibilidade foi realizada segundo os seguintes critérios: suscetível (a CIM do isolado está dentro da faixa de corte estipulada, pela norma de referência, como suscetível para o antifúngico), suscetibilidade dose-dependente (a sensibilidade depende da dose sugerida para o paciente), não sensível (não há certeza quanto à sensibilidade, os dados disponíveis não permitem a classificação como resistente) ou resistente (a CIM do isolado se encontra na faixa estipulada, pela norma de referência, como resistente para o antifúngico). Essa classificação só é possível quando existem valores interpretativos, ou seja, quando esses valores já foram publicados para cada espécie ou gênero frente a cada antifúngico. Existem, atualmente, valores para *Candida* frente à azóis, mas não



para testes com anfotericina B. Nesse último caso, utilizamos o valor CIM > 1 mg/L para atribuir resistência à estirpe, segundo CLSI 2008 e Diekema et al., (2009). Para os outros gêneros presentes nesse trabalho, como *Trichosporon*, não existem pontos de corte (*breakpoints*) definidos. Desse modo, adotou-se os pontos de corte de *Candida*, como em estudos anteriores (GUINEA et al., 2010; CHAGAS-NETO et al., 2009; PFALLER; DIEKEMA, 2004; PAPHITOU, 2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Identificação dos isolados

Dentre os 50 isolados utilizados neste trabalho, 41 de material de descarte e nove de jardim do fungo mutualista, encontraram-se as espécies listadas na tabela 1.

**Tabela 1** – Leveduras isoladas de ninhos das formiga cortadeira *A. balzani*

Grupo	Espécie	Código	Origem	Closest relative Genbank accession number
Ascomycetos				
	<i>Brettanomyces</i>	TO 776	Descarte	AY969108
	<i>naardenensis</i> (2)	TO 783	Descarte	
	<i>Candida albicans</i> (9)	TO207	Descarte	AB828131
		TO205	Descarte	
		TO770	Descarte	
		TO773	Descarte	
		TO774	Descarte	
		TO785	Jardim de fungo	
		TO788	Jardim de fungo	
		TO801	Descarte	
		TO804	Descarte	
	<i>Candida cellae</i> (4)	TO206	Jardim de fungo	AY861673
		TO208	Jardim de fungo	
		TO216	Jardim de fungo	
		TO217	Descarte	
	<i>Candida infanticola</i> (2)	TO811	Descarte	DQ438230
		TO814	Descarte	
	<i>Candida tropicalis</i> (3)	TO802	Descarte	AB772433
		TO803	Descarte	
		TO806	Descarte	
	<i>Kazachstania unispora</i> (2)	TO1115	Descarte	JQ861272
		TO1120	Descarte	

**Continuação da Tabela 1** – Leveduras isoladas de ninhos das formiga cortadeira *A. balzani*

Grupo	Espécie	Código	Origem	Closest relative Genbank accession number
Ascomycetos				
		TO210	Descarte	
		TO211	Descarte	
		TO777	Descarte	
		TO794	Jardim de fungo	
	<i>Meyerozyma caribbica</i>	TO795	Jardim de fungo	KC111450
	(10)	TO780	Descarte	
		TO800	Descarte	
		TO809	Descarte	
		TO1107	Descarte	
		TO1108	Descarte	
		TO1094	Descarte	
	<i>Meyerozyma</i>	TO1102	Descarte	KC798418
	<i>guilliermondii</i> (3)	TO1106	Descarte	
Basidiomicetos				
	<i>Cryptococcus</i> sp. (1)	TO209	Descarte	KC182138
	<i>Trichosporon asahii</i> (7)	TO1084	Descarte	
		TO1085	Descarte	
		TO1090	Descarte	
		TO1092	Descarte	EU559350
		TO1095	Descarte	
		TO1104	Descarte	
		TO1105	Descarte	
	<i>Trichosporon loubieri</i> (1)	TO769	Descarte	JN939448
		TO778	Descarte	
		TO779	Descarte	
	<i>Trichosporon</i>	TO1114	Descarte	JQ266092
	<i>mycotoxinivorans</i> (6)	TO1118	Descarte	
		TO1121	Jardim de fungo	
		TO1122	Jardim de fungo	

Dentre as leveduras consideradas patogênicas, o maior grupo é o das ascomicetas, onde se encontram as espécies do gênero *Candida*, sendo a *C. albicans* a mais importante

responsável por 45 a 60% das infecções da corrente sanguínea (KURTZMAN et al., 2011; PFALLER et al.; 2009). Mais de 17 espécies diferentes de *Candida* foram identificadas como agentes etiológicos de infecções da corrente sanguínea e aproximadamente 95% de todas essas infecções são causadas por quatro espécies: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (PFALLER; DIEKEMA, 2004). Neste trabalho verificamos que a espécie, mais comumente encontrada em casos clínicos, pode ser encontrada em associação com formigas cortadeiras, revelando um eventual nicho natural da espécie, de onde poderia, eventualmente ser disseminada. Outras espécies desse gênero como *Candida cellae* e *Candida infanticola*. Por serem espécies recentemente descobertas, não são muito conhecidos porém fazem parte de um gênero de grande importância clínica e por essa razão, estudar a resistência destas espécies aos antifúngicos pode ser de grande importância para ocasiões futuras.

A espécie *M. caribbica* já foi isolada de variados substratos como, cana-de-açúcar, solo e também de paciente com infecção fúngica, o que sugere uma ampla distribuição dessa espécie. Como *M. guilliermondii* é um patógeno humano oportunista, existe uma grande possibilidade de *M. caribbica* também ser, dada a grande semelhança entre as espécies. Visto que já foi relatada sua presença em infecção (KURTZMAN et al., 2011).

*Trichosporon asahii* encontra-se amplamente distribuída no ambiente e grande parte das cepas estudadas são isoladas de pacientes imunocomprometidos (KURTZMAN et al., 2011). É uma espécie conhecida por causar infecções invasivas profundas e podem ganhar a entrada para a corrente sanguínea através do trato respiratório ou gastrointestinal. A susceptibilidade à anfotericina B é variável nesse gênero, tem sido relatados fracassos clínicos com a anfotericina B e fluconazol. *T. loubieri*, outra espécie identificada nesse trabalho, não tinha sido isolada em humanos até recentemente, porém foram encontradas infectando um paciente com uma doença renal policística e a infecção foi controlada após uso de uma dose elevada de fluconazol anfotericina B. Em nosso trabalho foram isoladas seis linhagens *Trichosporon mycotoxinivorans*, espécie relacionada geneticamente com *T. loubieri* (MOLNAR et al; 2004). Por também ser uma espécie descoberta recentemente, não existem muitos relatos de sua presença em infecções fúngicas, mas estudar sua resistência também pode ser relevante já que é uma espécie muito próxima de *T. loubieri* e pertencente a um gênero com grande importância clínica.

*Kazachstania unispora* é uma espécie que já foi encontrada em substratos variados como, grãos, queijo e fezes (KURTZMAN et al., 2011). Não existem dados na literatura que relacionem essas espécies a infecções e patogenias, porém, como todas as espécies desse trabalho, essas também foram selecionadas pela técnica de flotação, uma técnica que já é

seletiva, pois contém três antibióticos e um antifúngico, sendo assim essas espécies já apresentaram uma resistência natural a alguns compostos e por isso testamos essa resistência com esses outros antifúngicos.

#### 4.2 Teste de microdiluição para determinação da CIM

Primeiramente os testes foram realizados com as cepa-controle que já possuem os pontos de corte específicos e os resultados obtidos às 24 h e 48 h foram os valores de CIM esperados para cada antifúngico. Para *C. krusei*, esses valores ficaram entre 16 a 32mg/L para fluconazol (a espécie possui resistência intrínseca a este antifúngico), 0,25 a 1mg/L para itraconazol, 0,5 a 2mg/L para anfotericina B, 0,12 a 0,5mg/L para o voriconazol e 0,12 a 1mg/L para posaconazol. Para *C. parapsilosis* as faixas de CIMs determinaram valores de 0,5 a 2mg/L para fluconazol, 0,12 a 0,25mg/L para itraconazol, 1 a 2mg/L para anfotericina B, 0,03 a 0,12mg/L para voriconazol e 0,06 a 0,25mg/L para posaconazol. Todos esses valores estão dentro das recomendações da norma M27-A2 (CLSI, 2002). Não existem faixas determinadas para a caspofungina.

Na comparação entre as leituras visuais e as efetuadas com o espectrofotômetro através da absorbância, a maior variação observada foi de no máximo uma diluição, para mais ou para menos, o que está dentro da norma CLSI (2002). Quando houve diferença da leitura visual para a de espectrofotômetro foram considerados os resultados obtidos através das leituras de absorbância.

Nenhum dos isolados (TO1115 e TO1120) da espécie *Kazachstania unispora* apresentou crescimento de células nos testes e o mesmo ocorreu com três (TO206, TO208, TO216) dos quatro isolados da espécie *Candida cellae*. Isso pode indicar uma sensibilidade desses isolados a algum composto presente meio de cultura RPMI-1640, ou a impossibilidade de crescimento no pH em que esse meio se encontra.

Na Tabela 2 estão os resultados de CIM de acordo com a classificação em categorias de suscetibilidade da Norma M-27 (CLSI, 2008) para as espécies de *Candida*. Alguns resultados demonstraram diferença de uma diluição entre a leitura visual de 24h e 48h, mas a maioria não alterou a categoria de interpretação, ou seja, não resultou em uma mudança da classificação da estirpe de “sensível” para “resistente”. Porém, alguns isolados passaram de sensíveis dose-dependente à resistentes frente ao itraconazol, e de sensíveis à resistentes frente à anfotericina B, no entanto, não é caracterizado como *trailing*, quando isso ocorre com

a anfotericina B, 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)

**Tabela 2:** CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) obtida a partir dos testes de suscetibilidade

Antifúngicos – (24 - 48 horas)						
Levedura	Anfotericina B	Voriconazol	Fluconazol	Itraconazol	Caspofungina	Posaconazol
<i>B. naardenensis</i>						
TO 776	0,25-0,5	0,06-0,12	8-8	0,06-0,12	1-1	0,007-0,007
TO 783	0,25-0,5	0,007-0,007	0,25-0,5	0,007-0,007	2-2	0,007-0,007
<i>C. albicans</i>						
TO 202	1-1	0,015-0,015	0,25-0,25	0,015-0,015	0,25-0,25	0,007-0,007
TO 205	1-1	0,015-0,015	0,25-0,25	0,015-0,015	0,12-0,12	0,007-0,007
TO 770	0,5-1	0,015-0,015	0,25-0,25	0,015-0,015	0,12-0,12	0,007-0,007
TO 801	<b>2-4</b>	0,015-0,015	0,25-0,25	0,015-0,015	0,25-0,25	0,007-0,007
TO 804	<b>2-4</b>	0,015-0,015	0,25-0,25	0,015-0,015	0,12-0,25	0,007-0,007
TO 785	1-2	0,015-0,015	0,25-0,25	0,015-0,015	0,25-0,25	0,007-0,007
TO 773	1-2	0,015-0,015	0,12-0,25	0,015-0,015	0,12-0,25	0,007-0,007
TO 774	1-1	0,015-0,015	0,12-0,25	0,015-0,015	0,12-0,25	0,007-0,007
TO 788	1-2	0,015-0,015	0,12-0,25	0,015-0,015	0,12-0,12	0,007-0,007
<i>C. infanticola</i>						
TO 811	0,5-2	0,25-0,25	4-8	<b>0,25-0,25*</b>	1-2	0,25-0,5
TO 814	0,5-2	0,12-0,25	4-8	0,12-0,25	1-1	0,25-0,5
<i>C. tropicalis</i>						
TO 802	0,5-1	0,015-0,03	0,25-0,25	0,015-0,015	0,25-0,25	0,007-0,007
TO 803	1-2	0,015-0,03	0,25-0,5	0,03-0,03	0,12-0,12	0,007-0,007
TO 806	0,5-2	0,03-0,12	0,5-1	0,06-0,12	0,12-0,12	0,007-0,007
<i>C. cellae</i>						
TO 217	0,5-1	0,06-0,012	2-2	0,25-0,25	1-1	0,06-0,06
<i>Cryptococcus sp.</i>						
TO 209	0,5-0,5	0,06-0,12	4-8	<b>0,25-0,5*</b>	1-1	0,007-0,007

Continuação da Tabela 2: CIM ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) obtida a partir dos testes de suscetibilidade

Antifúngicos – (24 - 48 horas)						
Código da estirpe	Anfotericina B	Voriconazol	Fluconazol	Itraconazol	Caspofungina	Posaconazol
<i>M. caribbica</i>						
TO 210	0,5-1	0,06-0,25	4-8	<b>0,25-0,5*</b>	0,5-2	0,007-0,007
TO 211	0,5-0,5	0,12-0,5	2-4	<b>0,25-0,5*</b>	1-1	0,03-0,03
TO 800	0,25-0,5	0,015-0,015	0,25-0,25	0,015-0,03	0,12-0,12	0,007-0,007
TO 809	0,5-0,5	0,06-0,25	2-4	<b>0,25-0,25*</b>	2-2	0,007-0,007
TO 794	1-1	0,12-0,5	4-16	<b>0,25-0,5*</b>	1-2	0,007-0,007
TO 795	0,5-0,5	0,25-0,5	8-16	<b>0,25-0,5*</b>	1-1	0,007-0,007
TO 777	0,5-1	0,06-0,25	4-8	<b>0,25-0,5*</b>	1-2	0,007-0,015
TO 780	0,5-0,5	0,25-0,5	8-16	<b>0,5-1*</b>	1-2	0,007-0,015
TO 1107	0,5-1	0,06-0,25	2-4	<b>0,25-0,25*</b>	1-1	0,007-0,007
TO 1108	0,5-1	0,06-0,25	<b>16-16*</b>	<b>0,25-0,25*</b>	1-2	0,007-0,015
<i>M. guilliermondii</i>						
TO 1094	0,5-0,5	0,12-0,25	8-16	<b>0,5-1*</b>	1-1	0,007-0,015
TO 1102	0,25-0,5	0,25-0,5	8-16	<b>0,5-1*</b>	2-2	0,015-0,03
TO 1106	0,5-1	0,06-0,25	4-8	0,12-0,25	1-1	0,007-0,007
<i>T. asahii</i>						
TO 1084	1-2	0,007-0,06	1-2	0,12-0,25	<b>8-8**</b>	0,007-0,007
TO 1085	1-2	0,015-0,06	1-2	0,06-0,12	<b>8-8**</b>	0,007-0,03
TO 1090	1-2	0,015-0,06	1-2	0,12-0,25	<b>8-8**</b>	0,007-0,03
TO 1092	1-2	0,03-0,06	1-2	0,12-0,12	<b>8-8**</b>	0,007-0,007
TO 1095	1-4	0,03-0,06	1-2	0,12-0,12	<b>8-16**</b>	0,06-0,06
TO 1104	1-4	0,03-0,12	2-2	0,12-0,12	<b>8-16**</b>	0,06-0,12
TO 1105	1-4	0,06-0,12	2-2	0,12-0,12	<b>8-16**</b>	0,06-0,06
<i>T. loubieri</i>						
TO 769	0,25-0,5	0,03-0,12	1-2	0,03-0,06	<b>8-16**</b>	0,007-0,03
<i>T. mycotoxinivorans</i>						
TO 778	<b>4-8</b>	0,25-0,25	2-2	0,12-0,12	2-2	0,12-0,12
TO 779	<b>4-8</b>	0,12-0,25	2-4	<b>0,25-0,5*</b>	2-4	0,12-0,25
TO 1114	<b>4-8</b>	0,12-0,12	2-4	<b>0,25-0,25*</b>	2-2	0,12-0,12
TO 1118	<b>2-4</b>	0,25-0,25	4-4	0,12-0,25	2-2	0,12-0,25
TO 1121	<b>4-8</b>	0,25-0,25	4-4	0,12-0,25	2-2	0,12-0,12
TO 1122	<b>2-4</b>	0,12-0,25	2-4	0,12-0,12	<b>4-8**</b>	0,12-0,12

**Negrito** = Resultados considerados resistentes; \* (SSD) Sensibilidade dose-dependente; \*\* para caspofungina a CLSI propôs o valor de (NS)  $> 2 \mu\text{g}/\text{ml}$  como não sensível, porém ainda não classificando-se como resistente. Anfotericina B – sensível (S), CIM  $\leq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; resistente (R), CIM  $\geq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; voriconazol - sensível (S), CIM  $\leq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; sensível dose-dependente (SDD), CIM  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; resistente (R), CIM  $\geq 4 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; fluconazol – sensível (S), CIM  $\leq 8 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; sensível dose-dependente (SDD), CIM  $16-32 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; resistente (R), CIM  $\geq 64 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; itraconazol – sensível (S), CIM  $\leq 0,125 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; sensível dose-dependente (SDD), CIM  $0,25-0,5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; resistente (R), CIM  $\geq 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; caspofungina – sensível (S), CIM  $\leq 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; não sensível (NS). CIM  $> 2 \mu\text{g}/\text{ml}$ ; posaconazol – Não existem ainda pontos de cortes definidos.

Na maioria dos testes observou-se que os valores de CIM para anfotericina B tenderam a ser maiores com o passar do tempo, como já descrito nos estudos de Diekema et al. (2009), Por isso, existe a orientação sobre a realização de leituras no menor tempo possível, desde que haja crescimento do isolado no controle-positivo (CLSI, 2008). Para fluconazol, voriconazol, itraconazol, posaconazol e caspofungina os valores entre as leituras de 24h e 48h também apresentaram diferenças para algumas espécies, porém não muito significativas (uma diluição maior).

Com raras exceções, todas as linhagens de *C. albicans* foram suscetíveis aos antifúngicos testados, divergindo dos resultados de Pfaller et al (1998) em que alguns isolados se mostraram resistentes ao fluconazol, itraconazol e voriconazol, o que é um indicativo do potencial de desenvolvimento de resistência dessa espécie contra os azóis. Em relação a anfotericina B, dois dos isolados (TO801 e TO804) se mostraram resistentes (CIM 2) e ambos foram coletados do material de descarte de um dos ninhos da segunda coleta. Este último resultado divergiu em relação aos encontrados por Pfaller et al. (2007), pois segundo esses autores, isolados de *Candida* com resultados de CIM >1 µg/ml para anfotericina B são incomuns. Entretanto, Blignaut et al. (2005) encontraram uma porcentagem significativa de isolados orais de *C. albicans* resistentes a anfotericina B com valores de CIM  $\geq 2$  µg/ml. Kelly et al (1996) também já haviam relatado duas cepas de *C. albicans*, isoladas de pacientes com AIDS, que apresentaram resistência devida a uma falha genética na síntese de esterol.

*C. infanticola* apresentou suscetibilidade dose-dependente ao itraconazol em um de seus isolados (TO811). Este comportamento está relacionado com a dose administrada ao paciente e consequente dose sérica para sua interpretação, conforme reportado (CLSI, 2002). Esta levedura foi suscetível aos outros antifúngicos, inclusive a caspofungina, o que diverge dos resultados encontrados por Shokohi et al. (2011) que mostraram que a caspofungina não apresentou atividade contra cepas de *C. infanticola* isoladas de lesões orofaríngeas de pacientes com câncer.

Os isolados de *Candida tropicalis* foram sensíveis a todos os antifúngicos testados. Estudos anteriores já haviam mostrado a alta sensibilidade dessa espécie aos antifúngicos itraconazol, posaconazol, voriconazol e caspofungina (OSTROSKY-ZEICHNER et al, 2003; PFALLER et al, 2004; CUENCA-ESTRELLA et al, 2006), porém essa espécie apresentou resistência ao fluconazol no trabalho de Pfaller et al., (2007) , divergindo dos resultados desse trabalho. Apesar de não serem considerados resistentes a anfotericina B, os três isolados de *Candida tropicalis* apresentaram valores altos de CIM em 24 horas (0,5-1µg/ml) para esse antifúngico, resultado também observado nos estudos de Pfaller et al. (2003).



O isolado de *Cryptococcus* sp. também apresentou suscetibilidade dose-dependente ao itraconazol, mas se mostrou suscetível aos demais antifúngicos testados. O gênero *Cryptococcus* também está entre os principais gêneros de leveduras causadoras de infecções, sendo o principal dentre os basidiomicetos. *C. neoformans* e *C. gattii*, por exemplo, são causadores da criptococose (KURTZMAN et al., 2011). Existem diferenças importantes na suscetibilidade aos antifúngicos azóis para diferentes espécies de *Cryptococcus* (SERENA et al., 2004) porém uma identificação correta em nível de espécie para esse isolado específico não foi possível, pois a linhagem que apresentou 100% de similaridade no banco de dados (CBS-KNAW) estava descrita apenas a nível de gênero.

Foi surpreendente verificarmos neste estudo que quase todos os isolados do gênero *Meyerozyma*, exceto dois (TO800 e TO1106), apresentaram sensibilidade dose-dependente ao itraconazol. Além disso, um dos isolados de *M. caribbica* (TO1108) apresentou sensibilidade dose-dependente também ao fluconazol (CIM 16-32µg/ml). Dois isolados de *M. guilliermondii* (ex-*Candida guilliermondii*) (TO1094 e TO1102) mostraram um valor de 8 µg/mL para o fluconazol, valor semelhante ao observado em *C. krusei*, espécie que possui uma resistência intrínseca a esse fármaco (CLSI, 2002). Porém, segundo a Norma M-27, esse valor ainda é considerado suscetível para *Candida*. Nos estudos de Pfaller e Diekema (2004) isolados obtidos a partir de culturas de osso infectado se mostraram resistentes ao fluconazol e itraconazol, o que indica que a espécie possa ser menos suscetível do que outras. Os mesmos autores relataram ainda que 90% dos isolados de *M. guilliermondii* sensíveis a anfotericina B semelhante aos resultados do presente estudo. Em contrapartida essa espécie apresentou resistência a esse antifúngico em estudos anteriores (DICK et al.; 1985).

Nota-se na tabela 2 que grande parte dos isolados de *Trichosporon* apresentou valores de CIM de 1µg/ml, o qual pode ser considerado elevado em relação a anfotericina B. Todos os isolados de *T. mycotoxinivorans* apresentaram resistência a esse antifúngico (CIM >1 µg/ml) o que pode representar um risco para a saúde em caso de disseminação pelos insetos, já que anfotericina B é considerado um antifúngico de primeira escolha em infecções invasivas por leveduras (GUINEA et al., 2010). Estudos realizados com isolados ambientais e clínicos mostraram que a anfotericina B tem baixa eficácia para espécie do gênero *Trichosporon* (PFALLER; DIEKEMA, 2004; LI et al., 2005; CHAGAS-NETO et al., 2009), o que foi confirmado em nosso estudo. Pfaller e Diekema (2004) trabalhando com 43 isolados clínicos de *T. asahii*, encontraram valor de CIM maior (4 mg/L) do que os observado nesse estudo (1 mg/L) Por outro lado, em relação aos novos triazóis, nossos isolados foram

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

Nossos dados, obtidos com amostras isoladas do meio ambiente, confirmaram observações prévias de estudos clínicos, nas quais não são recomendados tratamentos com anfotericina B em pacientes infectados por *Trichosporon* spp. (em particular *T. asahii*), especialmente, naqueles com alteração do sistema imunológico (PAPHITOU, 2002; PFALLER; DIEKEMA, 2004; LI et al., 2005; CHAGAS-NETO et al., 2009).

Quanto à caspofungina, todos os isolados de *T. asahii*, a linhagem de *T. loubieri* e um dos isolados de *T. mycotoxinivorans* não foram sensíveis a esse antifúngico. De acordo com a literatura as equinocandinas não apresentam muita atividade contra as espécies de *Trichosporon*, infecções foram relatadas mesmo com tratamento utilizando caspofungina (MARTY et al; 2003). Além desse estudo esse resultado também já havia sido observado em outros trabalhos (ESPINEL-INGROFF, 1998; TAWARA et al, 2000).

Nos estudos de Serena et al, (2004) os isolados de *T. asahii* apresentaram resistência ao antifúngico fluconazol e nos estudos clínicos de Pfaller e Diekema (2004) os valores de CIM para esse antifúngico foram relativamente mais altos (2mg/L a 8 mg/L), divergindo dos resultados do nosso estudo, onde não encontramos linhagens resistentes. Tal diferença pode ser explicada pela origem dos isolados, uma vez que, provavelmente, as leveduras isoladas de ambientes naturais nunca tiveram contato com estes fármacos. Porém, ainda nos estudos de Serena et al, (2004) também é possível observar valores elevados de CIM para anfotericina B em isolados de *T. asahii*. Por outro lado, os mesmos autores verificaram a sensibilidade de *T. asahii* aos azóis, voriconazol e itraconazol, o que também foi confirmado nesse trabalho.

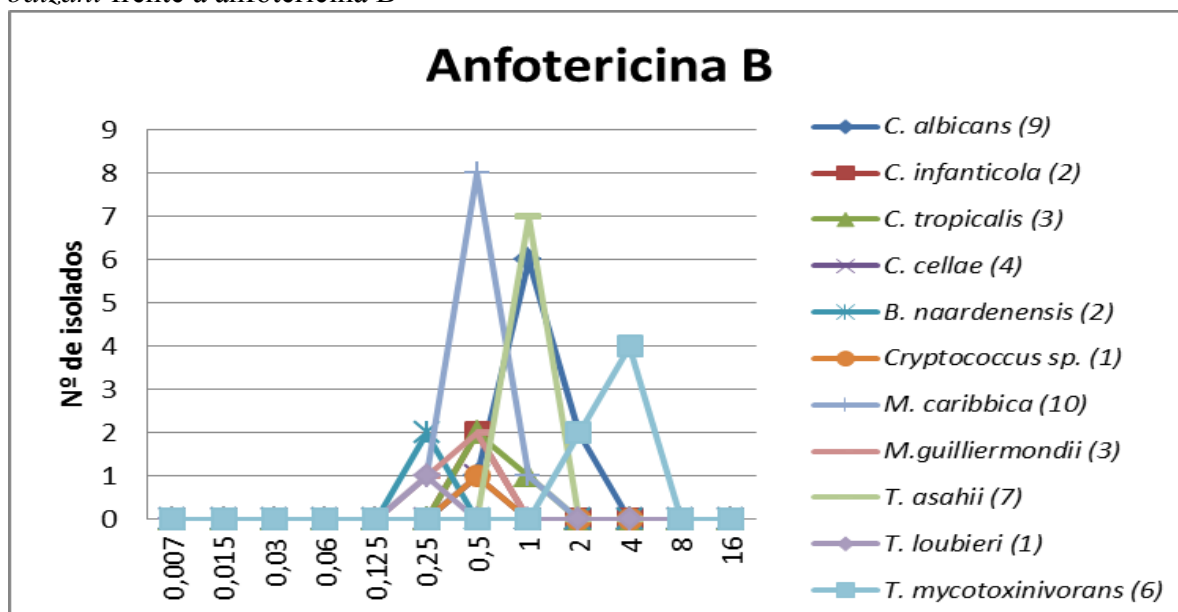
*T. asahii* já foi relatado como multirresistente a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, e flucitosina, porém os novos triazóis, tem sido mais ativos do que o fluconazol contra *Trichosporon*, sendo que, o voriconazol, foi utilizado com sucesso para tratar algumas infecções causadas por essa espécie (PFALLER; DIEKEMA, 2004).

Os dois isolados de *Brettanomyces naardenensis* apresentaram sensibilidade a todos os antifúngicos, não havendo relatos de patogenicidade desta espécie para humanos.

Todos os isolados foram suscetíveis ao voriconazol e ao posaconazol, e, apesar deste não apresentar pontos de cortes definidos, observamos que ele foi o antifúngico mais efetivo dentre todos os seis testados, com resultados de CIM muito baixos para praticamente todas as linhagens (CIM 0,007-0,12µg/ml) O único isolado que apresentou valores um pouco mais altos de CIM para esse antifúngico foi *Candida infanticola* (CIM 0,25µg/ml).

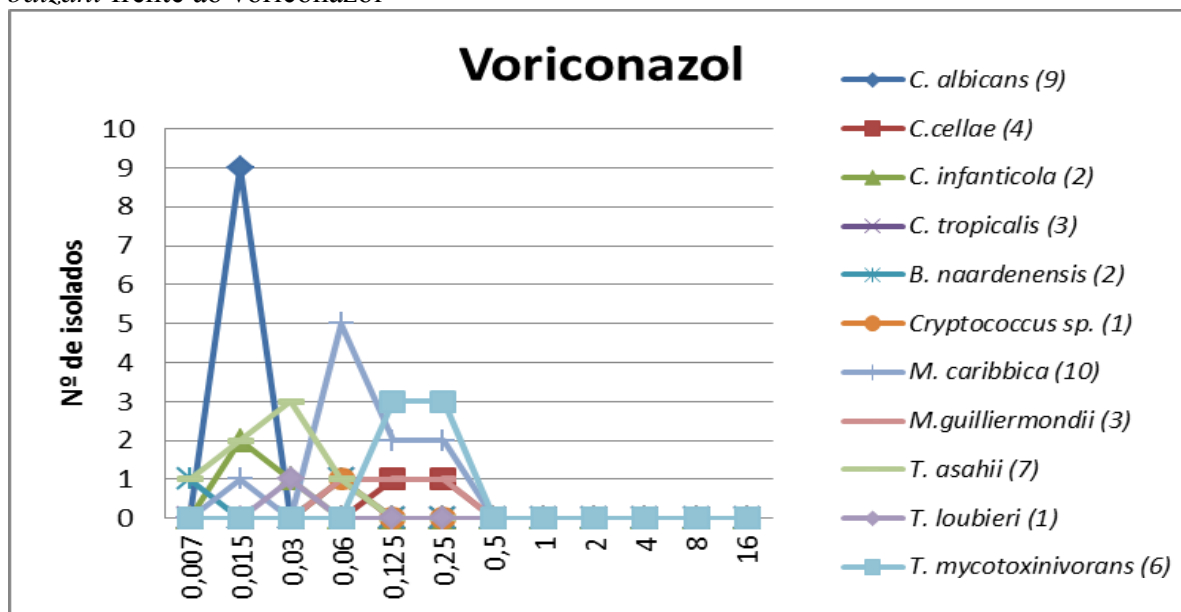
As figuras 7, 8, 9, 10, 11 e 12 permitem uma ampla visualização dos resultados obtidos para as 50 estirpes frente a anfotericina B, voriconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol e caspofungina, respectivamente.

**Figura 7** - Suscetibilidade (CIM, mg/L) de 50 leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* frente à anfotericina B



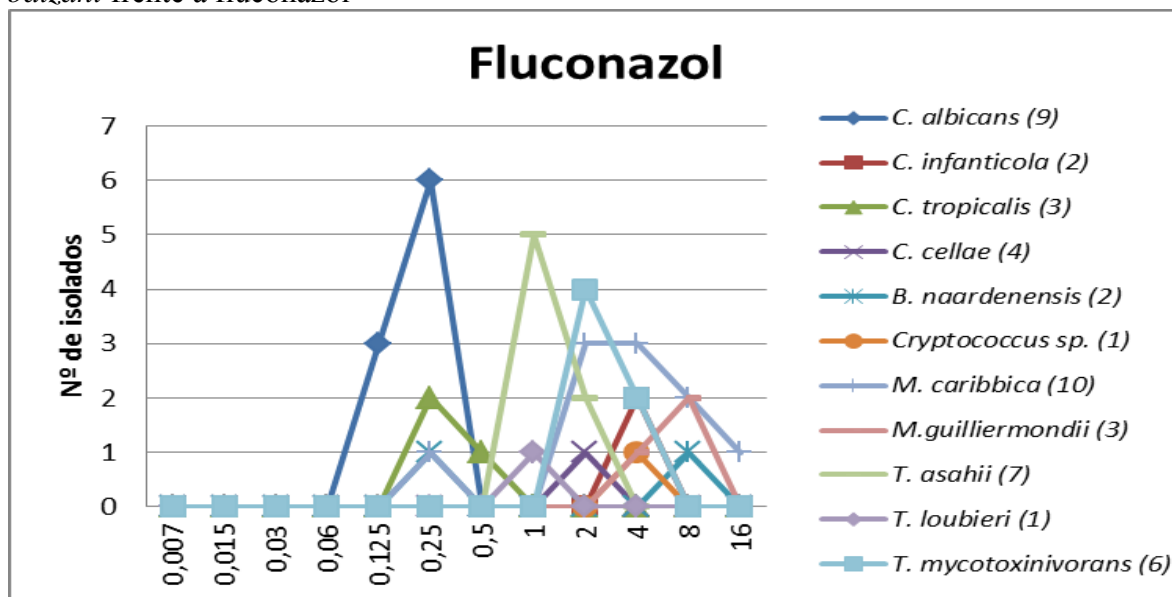
Na figura 7, observa-se que o pico da linha correspondente ao *T. mycotoxinivorans* é mais alto e mais deslocado para a direita do gráfico, devido ao número de estirpes (6) que apresentaram resistência ao fármaco (CIM  $\geq$  2mg/L). Além disso, *T. asahii* e *C. albicans* apresentam-se também mais a direita do gráfico devido aos altos valores de CIM (1mg/L) e aos dois isolados resistentes (CIM 2mg/L), respectivamente.

**Figura 8** - Suscetibilidade (CIM, mg/L) de 50 leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* frente ao voriconazol



Na figura 8, nota-se que os nove isolados de *C. albicans* apresentaram o mesmo resultado com CIM de 0,0015 mg/L sendo bastante suscetíveis ao voriconazol, além disso pode-se observar que não houve nenhum isolado resistente a esse antifúngico (CIM 2mg/L), sendo a maior CIM obtida em 0,25mg/L em alguns dos isolados.

**Figura 9** - Suscetibilidade (CIM, mg/L) de 50 leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* frente à fluconazol

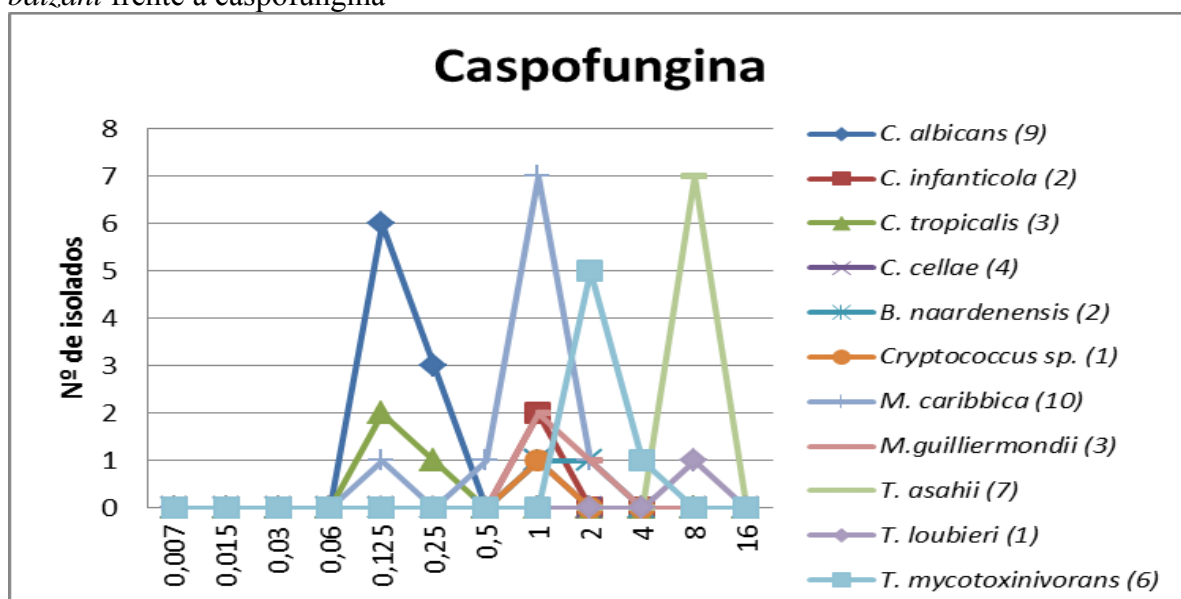


Na figura 9 podemos observar o único isolado de *M. caribbica* que apresentou suscetibilidade dose-dependente ao fluconazol com CIM de 16mg/L. Pode-se notar também



Na figura 11 nota-se que todos os isolados apresentaram valores de CIM muito baixos para o posaconazol, o que indica que esse antifúngico pode ser utilizado em infecções fúngicas para a maior parte dos isolados desse estudo, apesar de não ter determinado ainda seus pontos de corte. Os valores de CIM mais altos para esse fármaco foi 0,25 mg/L para os dois isolados de *C. infanticola* e 0,12 mg/L para os seis isolados de *T. mycotoxinivorans*.

**Figura 12-** Suscetibilidade (CIM, mg/L) de 50 leveduras isoladas de ninhos de *Acromyrmex balzani* frente à caspofungina



Na figura 12 é possível observar valores altos de CIM (8 mg/L) para os isolados de *T. asahii* e para o isolado de *T. loubieri* além de um dos isolados de *T. mycotoxinivorans* com CIM 4 mg/L. Todos esses valores caracterizam uma sensibilidade dose-dependente de tais isolados. Além disso nota-se que o valor de CIM menor observado para esse antifúngico foi 0,12mg/L o que indica que esse antifúngico não é tão eficiente frente as espécies estudadas.

## 5 CONCLUSÃO

Nesse trabalho, os 50 isolados dos ninhos de *Acromyrmex balzani* foram identificados e a maioria pertence a espécies que já haviam sido isolados de casos clínicos. Portanto, podemos afirmar que os ninhos dessa espécie podem servir como um reservatório natural de leveduras potencialmente patogênicas. De um modo geral, as leveduras foram sensíveis aos principais antifúngicos utilizados rotineiramente na clínica médica. Entretanto, 29 apresentaram algum padrão de resistência à pelo menos um dos antifúngicos testados e quatro dentre elas (TO1108, TO779, TO1114, TO1102) se mostraram não suscetíveis a dois antifúngicos diferentes.

As linhagens utilizadas neste trabalho foram obtidas do meio ambiente e possivelmente nunca haviam tido contato anterior com esses fármacos, o que causa preocupação, pois indica que os ninhos das formigas podem abrigar espécies de leveduras que apresentam risco potencial à saúde, pois podem ser disseminadas pelas formigas.

## REFERÊNCIAS

ALMEIDA, J.M.G.C.F. **Yeasts community survey in the Tagus estuary.** FEMS Microbiology Lett, v. 53, p. 295-303, 2005.

ANDRADE, M.L. **Bionomia e Distribuição Geográfica do Gênero Acromyrmex Mayr, 1865 (Hymenoptera: Formicidae) no Estado de São Paulo, Brasil.** 1991. 120f. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade Estadual Julio de Mesquita Filho – UNESP, Botucatu, 1991.

BLIGNAUT, E.; MOLEPO, J.; PUJOL, C.; SOLL, D.R.; PFALLER, M.A. Clade-related amphotericin B resistance among South African *Candida albicans* isolates. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** 53:29-31, 2005.

CARREIRO, S. C.; PAGNOCCA, F. C.; BUENO, O. C.; BACCI JÚNIOR, M.; HEBLING, M. J. A.; DA SILVA, O. A. Yeast associated with nests of the leaf-cutting ant *Atta sexdens rubropilosa* Forel, 1908. **Antonie Van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v. 71, n. 3, p. 243-248, 1997.

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.

CARRILLO-MUÑOZ, A. J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P. A.; QUINDÓS, G. Antifungal agents: mode of actions in yeast cells. **Revista Española de quimioterapia**, ilbao, v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

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.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**, 3rd ed. Approved standard M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, 2008.

COOPER, C. R. Jr. Yeasts Pathogenic to Humans. In: **The yeasts, a taxonomic study.** 15. ed. Amsterdam: Elsevier, 2011.1v.

CUENCA-ESTRELLA M.; GOMEZ-LOPEZ A.; MELLADO E.; BUITRAGO M.J.; MONZON A.; RODRIGUEZ-TUDELA J.L. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. **Antimicrob. Agents Chemother.** v.50, p.917-921, 2006.

DELLA LUCIA, T. M. C.; FOWLER, H. G. As formigas cortadeiras. In: DELLA LUCIA, T.M. C. As formigas cortadeiras. Vicosa: Editora Folha de Vicosa, 1993. p. 1-3.



DIEHL, E.; CAVALLI-MOLINA, S.; ARAÚJO, A.M. Isoenzyme variation in the leafcutting ants *Acromyrmex heyeri* and *Acromyrmex striatus* (Hymenoptera, formicidae). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v. 25, n.2, p.173-178, 2002.

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.

DUARTE APM, PAGNOCCA FC, BARON NC, MELHEM MSC, PALMEIRA GA, ANGELIS DF, ANGELIS DA. In Vitro Susceptibility of Environmental Isolates of *Exophiala dermatitidis* to Five Antifungal Drugs. **Mycopathologia** nov. 2012.

ESPINEL-INGROFF, A. Comparison of in vitro activities of the new triazole SCH56592 and the echinocandins MK0991 (L-743,872) and LY303366 against opportunistic filamentous and dimorphic fungi and yeasts. **J. Clin. Microbiol.** v. 36 p. 2950–2956, 1998.

GHANNOUM, M.A.; RICE, L.B. Antifungal agents: mode of action mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical Microbiology Reviews.** v.12 n. 4 p. 501-517. 1999.

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.

KELLY S. L., LAMB D. C., KELLY D. E., LOEFFLER J., EINSELE H. Resistance to fluconazole and amphotericin in *Candida albicans* from AIDS patients. **Lancet** v. 348 p. 1523–1524, 1996

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.

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.

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

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.

MARICONI, F.A.M. **As saúvas.** São Paulo: Agronômica Ceres, 1970. 167p.

MARTY, Francisco M. et al. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. **Journal of clinical microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5317, 2003.

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

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.

OSTROSKY-ZEICHNER L.; REX J.H.; PAPPAS P.G.; HAMILL, R.J.; LARSEN R.A.; HOROWITZ H.W.; POWDERLY W.G.; HYSLOP, N.; KAUFFMAN C.A.; CLEARY J.; MANGINO J.E.; LEE J. Antifungal susceptibility survey of 2,000 blood- stream *Candida* isolates in the United States.. **Antimicrob. Agents Chemother.**; v. 47 p. 3149–3154, 2003

PFALLER, M. A. The epidemiology of invasive mycoses: narrowing the gap. **Clin. Infect. Dis.** v. 27 p. 1148–1150, 1998

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J.; R. JONES, N.; SADER, H. S.; FLUIT, A.C.; HOLLIS, R.J.; MESSER,S.A.; AND THE SENTRY PARTICIPANT GROUP. International Surveillance of Bloodstream Infections Due to *Candida* Species: Frequency of Occurrence and In Vitro Susceptibilities to Fluconazole, Ravuconazole, and Voriconazole of Isolates Collected from 1997 through 1999 in the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 39, N. 9, p. 3254–3259, 2001

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D.J.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; HOLLIS, R. J.; JONES, R. N. In Vitro Activities of Voriconazole, Posaconazole, and Four Licensed Systemic Antifungal Agents against *Candida* Species Infrequently Isolated from Blood,4,5, **Journal Of Clinical Microbiology**, V. 41, N. 1, p. 78–83, Jan. 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.

PFALLER, M.A.; MESSER S.A.; BOYKEN L.; HOLLIS R.J.; RICE C.; TENDOLKAR S.; DIEKEMA D.J. In vitro activities of voriconazole, posaconazole, and fluconazole against 4,169 clinical isolates of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* collected during 2001 and 2002 in the ARTEMIS Global Antifungal Surveillance Program. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v.48, p.201– 205, 2004.

PFALLER, M.A.; PAPPAS, P.G.; WINGARD, J.R. Invasive fungal pathogens: current epidemiological trends. **Clin. Infect. Dis.** v. 43, S3–S14. 2006.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 20 n. 1 p. 133-163, 2007

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D. J., GIBBS, D. L.; NEWELL, V. A.; BIJIE, H.; DZIERZANOWSKA, D.; KLIMKO, N. N.; LETSCHER-BRU, V.; LISALOVA, M.; MUEHLETHALER, K.; RENNISON, C.; ZAIDI, M. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of Noncandidal Yeast Species to Fluconazole and Voriconazole Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion Testing. **Journal of Clinical Microbiology**. v.47 n.1 p. 117–123. Jan. 2009.

PAGNOCCA, F. C.; CARREIRO, S. C.; BUENO, O. C.; HEBLING, M. J.; DA SILVA, O. A. Microbiological changes in the nests of leaf-cutting ants fed on sesame leaves. *Journal of Applied Entomology*, Berlin, v. 120, n. 5, p. 317-320, 1996.

PAGNOCCA F.C.; LEGASPE, M.F.C.; RODRIGUES, A.; RUIVO, C.C.C.; NAGAMOTO, N.S.; BACCI JR, M.; FORTI, L.C. Yeasts isolated from a fungus-growing ant nest, including the description of *Trichosporon chiarellii* sp. nov., an anamorphic basidiomycetous yeast. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v.60 p.1454–1459. 2010.

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, p. 262-283. 2011.

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.

REVANKAR SG, KIRKPATRICK WR, MCATEE RK, FOTHERGILL AW, REDDING SW, RINALD, MG, PETTERSON TF. Interpretation of Trailing Endpoints in Antifungal susceptibility Testing by the National Committee for Clinical Laboratory Standards Method. **Journal of Clinical Microbiology**, Jan. 1998, p. 153–156.

ROTH, F.J.; AHEARN, D.G.; FELL, J.W.; MEYERS, S.P.; MEYER, A.A. Ecology and taxonomy of yeasts isolated from various marine substrates. **Limnology and Oceanography**. v.7, n. 2. p. 178-185. Abr. 1962.

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

SATOW, M.M.; ATTILI-ANGELIS, D.; DE HOOG, G.S.; DE ANGELIS, D.F.; VICENTE, V.A. Selective factors involved in oil flotation isolation of black yeasts from the environment. *Stud Mycol.*; v.61, p. 157–63, 2008

SERENA, C.; PASTOR, F.J.; ORTONEDA, M.; CAPILLA, J.; NOLARD, N.; GUARRO, J. In Vitro Antifungal Susceptibilities of Uncommon Basidiomycetous Yeasts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**. v. 48, p. 2724–2726, N. 7, 2004.

SHOKOHI, T.; BANDALIZADEH, Z.; HEDAYATI, M.T.; MAYAHI, S. In vitro antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from oropharyngeal lesions of patients with cancer to some antifungal agents. **Jundishapur J Microbiol.**; 4(Supplement 1): S19-S26. 2011.

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.

SILVA, K. S.; CASTELLANI, M. A.; FORTI, L. C.; MOREIRA, A. A.; LEMOS, O. L.; CARNEIRO, R. C. S.; KHOURI, C. R.; RIBEIRO, A. E. L. Architecture of nests of *Acromyrmex* (Moellerius) *balzani* (Formicidae: Myrmicini: Attini) in pasture. **Revista Brasileira de Tecnologia Aplicada nas Ciências Agrárias**, Paraná, v. 3, n. 2, p. 99116, 2010.

STRATFORD, M.; BOND, C.J.; JAMES, S.A.; ROBERTS, N.; STEELS, H. *Candida davenportii* sp. nov., a potential soft-drinks spoilage yeast isolated from a wasp. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. v. 52, n. 4 p. 1369-1375, jul. 2002.

TAWARA, S.; IKEDA, F.; MAKI, K.; MORISHITA, Y.; OTOMO, K.; TERATANI, N.; GOTO, T.; TOMISHIMA, M.; OHKI, H.; YAMADA, A.; KAWABATA, K.; TAKASUGI, H.; SAKANE, K.; TANAKA, H.; MATSUMO, F.; KUBAHARA, S. In vitro activities of a new lipopeptide antifungal agent, FK463, against a variety of clinically important fungi. **Antimicrob. Agents Chemother**. v. 44 p. 57–62, 2000.

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

YARROW, D. Methods for the isolation and identification of yeasts. **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Edited by C. P. Kurtzman & J. W. Fell. Amsterdam: Elsevier. 4th edn, p. 77–100, (1998).

**APÊNDICE A** - Faixas de CIM de seis antifúngicos frente a 11 espécies de leveduras, com base em leitura visual.

Espécie (nº de isolados)	Tempo de incubação (h)	Faixa de CIM (mg/L)					
		FCZ	VCZ	ITZ	PCZ	AMB	CSP
<i>C. albicans</i> (9)	24	0,12-0,25	0,015	0,015	0,007	0,5-2	0,12-0,25
	48	0,25	0,015	0,015	0,007	1-4	0,12-0,25
<i>C. cellae</i> (1)	24	2	0,06	0,25	0,06	0,5	1
	48	2	0,12	0,25	0,06	1	1
<i>C. infanticola</i> (2)	24	4	0,12-0,25	0,12-0,25	0,25	0,5	1
	48	8	0,25	0,25	0,5	2	1-2
<i>C. tropicalis</i> (3)	24	0,25-0,5	0,015-0,03	0,015-0,06	0,007	0,5-1	0,12-0,25
	48	0,25-1	0,03-0,12	0,015-0,12	0,007	1-2	0,12-0,25
<i>B. naardenensis</i> (2)	24	0,25-8	0,007-0,06	0,007-0,06	0,007	0,25	1-2
	48	0,5-8	0,007-0,12	0,007-0,12	0,007	0,5	1-2
<i>Cryptococcus sp.</i> (1)	24	4	0,06	0,25	0,007	0,5	1
	48	8	0,12	0,5	0,007	0,5	1
<i>M. caribbica</i> (10)	24	0,25-1	0,015-0,25	0,015-0,5	0,007-0,03	0,25-1	0,12-2
	48	0,5-1	0,015-0,5	0,03-1	0,007-0,03	0,5-1	0,12-2
<i>M. guilliermondii</i> (3)	24	4-8	0,06-0,25	0,12-0,5	0,007-0,015	0,25-0,5	1-2
	48	8-16	0,25-0,5	0,25-1	0,007-0,03	0,5-1	1-2
<i>T. asahii</i> (7)	24	1-2	0,007-0,06	0,06-0,12	0,007-0,03	1	8
	48	2	0,06-0,12	0,12-0,25	0,03-0,12	2-4	8-16
<i>T. loubieri</i> (1)	24	1	0,03	0,03	0,007	0,25	8
	48	2	0,12	0,06	0,03	0,5	16
<i>T. mycotoxinivorans</i> (6)	24	2-4	0,12-0,25	0,12-0,25	0,12	2-4	2-4
	48	2-4	0,12-0,25	0,12-0,5	0,12-0,25	4-8	2-8

**APÊNDICE B** – Ninhos de *Acromyrmex balzani* de áreas de cerrado em Palmas TO



Foto: Weilan G. da P. Melo

Torre de fragmentos de palha na abertura do ninho da formiga *A. balzani*

**ANEXO A – CONSTITUINTES DOS MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS****Tabela 3** - 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	1000mL

**Tabela 4** - Constituintes do CHROMágar® Candida (Difco)

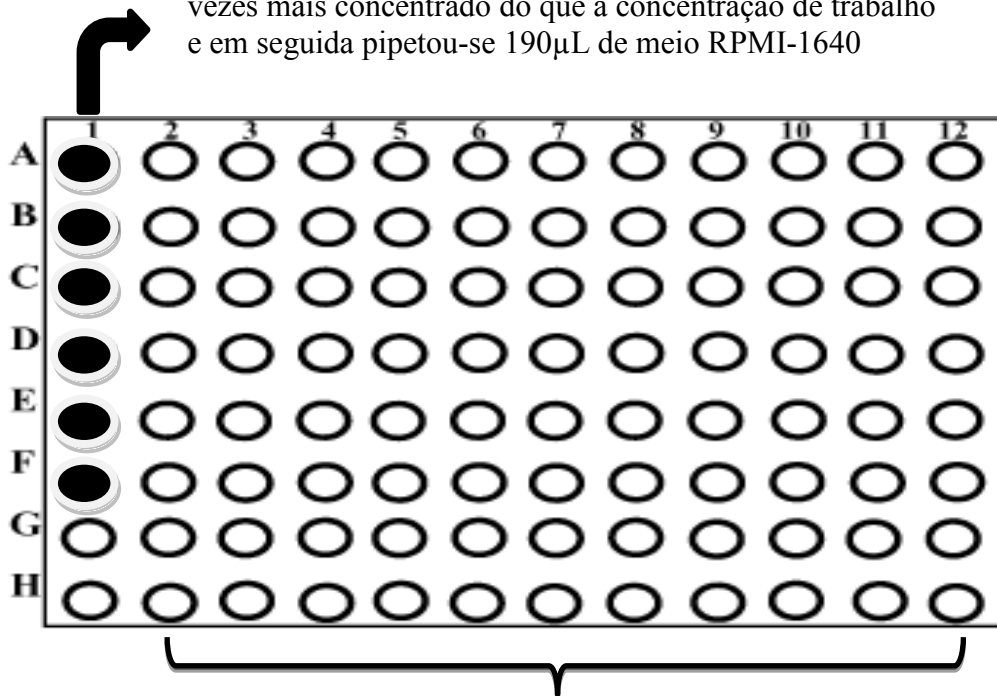
Componentes	Quantidades (em g/L)
Chromopeptona	10,2
Glicose	20,0
Chromogen Mix	2,0
Chloranfenicol	0,5
Agar	15,0

**Tabela 5-** 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-isoileucina	0,050	Tiamina HCl	0,001
L-leucina	0,050	Vitamina B12	0,000005
L-lisina . HCl	0,040	Nitrato de cálcico x H2O	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	Glutationa, reduzida	0,001
L-tirosina . 2Na	0,02883	Vermelho fenol, Na	0,0053
L-valina	0,020		

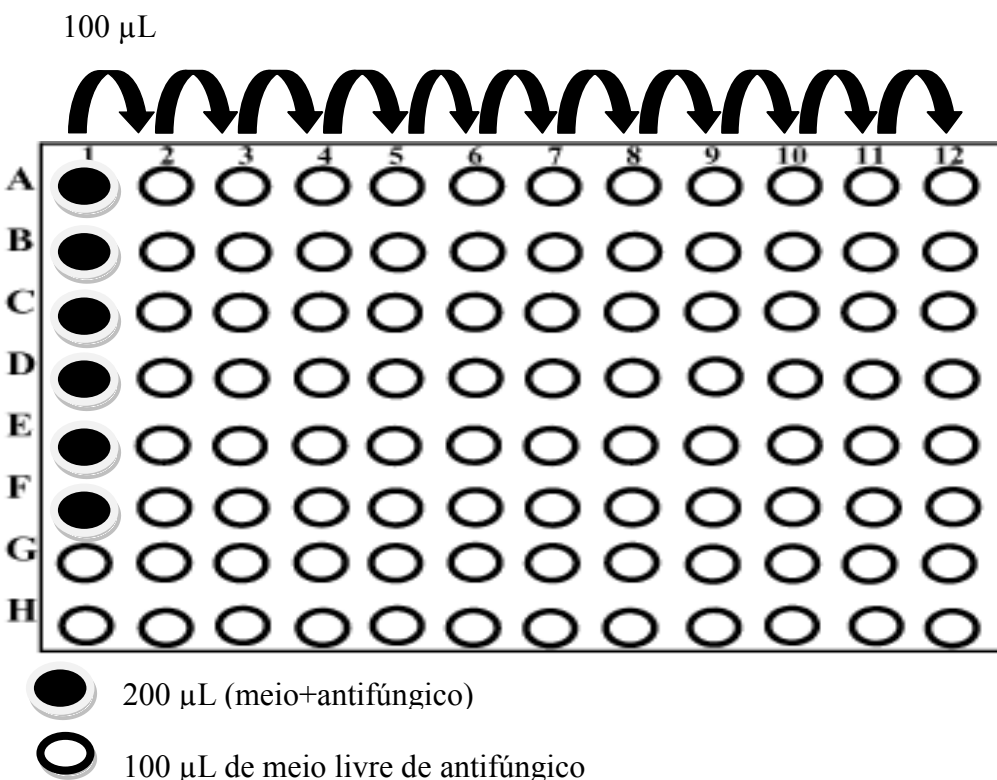
## ANEXO B – PREPARAÇÃO DAS MICROPLACAS

Na primeira coluna pipetou-se 10 $\mu$ L de antifúngico duas vezes mais concentrado do que a concentração de trabalho e em seguida pipetou-se 190 $\mu$ L de meio RPMI-1640



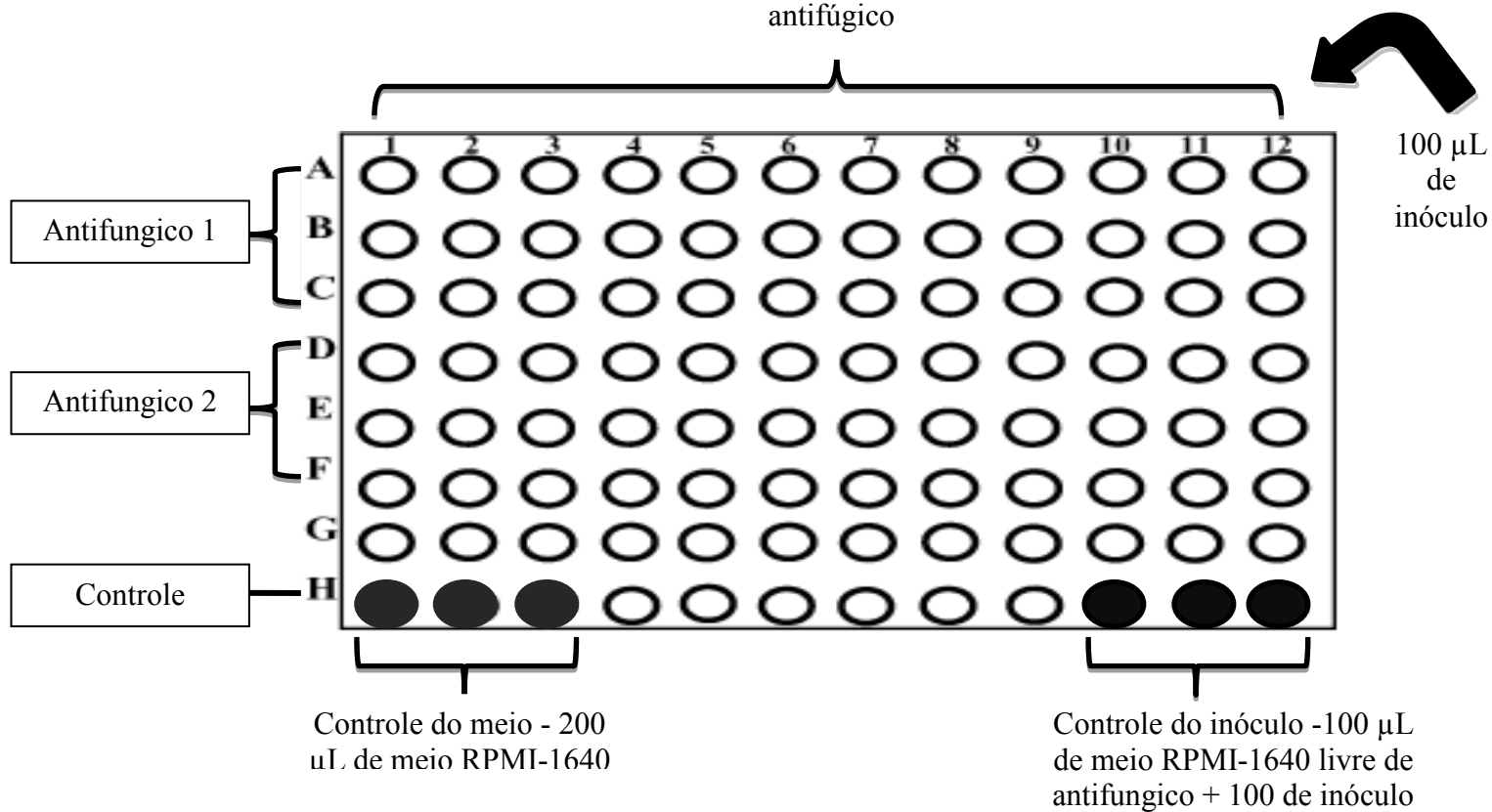
Pipetou-se 100  $\mu$ L de meio RPMI-1640 no restante da placa, exceto na linha do controle e na linha não utilizada

Em seguida, retirou-se 100  $\mu$ L da primeira coluna que foi passado para a segunda coluna e misturado aos 100  $\mu$ L de meio presente. Depois retirou-se 100  $\mu$ L da segunda coluna passando para a terceira coluna e assim sucessivamente de forma que a concentração cairá pela metade a cada coluna





Finalizando a diluição seriada os poços da placa ficaram com 100 $\mu$ L de meio + antifúngico nas concentrações de 16 $\mu$ g/mL a 0,007 $\mu$ g/mL ou de 64 $\mu$ g/mL a 0,03 $\mu$ g/mL, dependendo do antifúngico. Em seguida colocou-se os 100 $\mu$ L de inóculo em todos os poços contendo antifúngico



---

Daniela Tura de Almeida

Aluna

---

Prof. Dr. Fernando Carlos Pagnocca

Orientador