

AÇÃO "IN VITRO" DO KETOCONAZOL SOBRE PROTOTECAS E FISSURICELLA FILAMENTA

Maria José Soares MENDES (1) e Carlos da Silva LACAZ (2)

R E S U M O

Os Autores estudaram *in vitro*, a ação do ketoconazol sobre prototecas e a *Fissuricella filamenta*, determinando a concentração inibitória mínima para este novo derivado imidazólico. Trabalhando com concentrações variando de 320 a 0,31 µg/ml de meio de cultura, os resultados obtidos indicam que somente a *Fissuricella filamenta* sofre a ação do ketoconazol, na concentração de 10 µg/ml. Face a tais resultados, não se indica a aplicação do ketoconazol no tratamento das prototecoses. Uma conclusão que talvez possa ter interesse em taxonomia é a de que o comportamento "in vitro" da *Fissuricella filamenta* face a esta droga, é bem diferente do que se observou com as prototecas. Trata-se de mais um argumento para diferenciar *F. filamenta* das prototecas.

I N T R O D U Ç Ã O

Ketoconazol é um derivado imidazólico que vem sendo utilizado, ainda em caráter experimental, no tratamento de algumas micoses profundas (paracoccidioidomicose e histoplasmoses, principalmente) e de dermatomicoses superficiais provocadas por dermatófitos, *Candida albicans* e *Malassezia furfur* (*Pityrosporum orbiculare*).

Para uso clínico, a droga é apresentada sob a forma de comprimidos — 200 mg, sendo bem tolerada. Sua atividade terapêutica vem sendo estudada por diversos grupos de investigadores, principalmente latino-americanos. Os resultados até agora obtidos mostram tratar-se de droga bastante promissora na terapêutica das micoses (SYMOENS¹⁰).

"In vitro", para se avaliar a ação do ketoconazol, utilizamos amostras de *Candida albicans* e *Trichophyton mentagrophytes*. Tais fungos são bastante sensíveis, pois concentrações de 0,1 e 1 µg/ml, respectivamente, inibem seu crescimento.

Para a dosagem, no soro ou plasma, do ketoconazol, utiliza-se principalmente como "microrganismo padrão" "cepa" de *Candida albicans* cedida pelo Laboratório Janssen, onde este fármaco foi sintetizado.

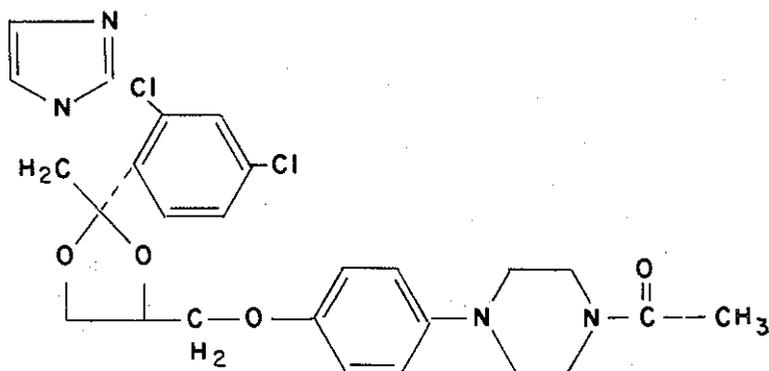
Ketoconazol (cis-1-acetil-4-[2-(2,4-diclorofenil)-2(1H-imidazol-1-metil)-1,3-dioxolan-4-metil] fenil} piperazina tem a seguinte fórmula estrutural (pág. 307).

Seu mecanismo de ação antifúngica assemelha-se ao dos antibióticos poliênicos, qual seja, a inibição da incorporação do acetato na síntese do ergosterol, inibindo assim, a biosíntese desse composto.

Aplicado por via oral, 200 mg diariamente, quando a absorção da droga se faz de modo satisfatório, 1 a 8 h após, demonstram-se níveis séricos ao redor de 5 a 0,7 µg/ml, o suficiente para, "in vitro", exercer nítida atividade contra a maioria dos fungos sensíveis à droga.

(1) Assistente do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo (Laboratório de Micologia Médica)

(2) Diretor do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil. Chefe do Laboratório de Micologia Médica



KETOCONAZOL

O propósito da presente investigação foi o de verificar a ação "in vitro" do ketoconazol sobre prototecas, incluindo-se a antiga *Prototheca filamenta*, enquadrada por PORE & col.⁷ em novo gênero-*Fissuricella*, reino Fungi. Fundamentalmente, as razões desse novo "posicionamento" foram baseadas em aspectos micromorfológicos, onde se verifica a presença de células hialinas, arredondadas, em forma de cubos, podendo ocorrer a presença de pseudohifas e células gemulantes.

As prototecas, algas aclorofiladas, presentes principalmente na água doce, possuem características muito semelhantes às de fungos, corando-se pelos mesmos métodos histoquímicos, sensíveis "in vitro" à ação da anfotericina B e da fungicidina (SEGAL & col.⁹), cultivando-se em ágar-Sabouraud, à temperatura ambiente. Em trabalho publicado por AJELLO¹, este pesquisador incluiu as prototecas no reino Fungi. Nos livros de LACAZ⁶, RIPPON⁸, BAKER & col.², EMMONS & col.⁴ e HAZEN & col.⁵, dedicados à Micologia Médica, capítulo especial aborda o tema prototecas e prototecoses.

Agindo geralmente como agentes oportunistas, tais microrganismos vêm assumindo crescente importância em patologia humana e veterinária. Contribuições valiosas ao estudo das prototecas foram realizadas entre nós por CARMARGO³ e, na Venezuela, por VOLCÁN G.¹¹

No trabalho de SEGAL & col.⁹, encontra-se referência à ação "in vitro" do miconazol (também derivado imidazólico) sobre diversas amostras de prototecas e de *Fissuricella filamenta*. Segundo esses Autores, a referida droga inibe o crescimento da *Fissuricella filamen-*

ta, em concentrações variáveis de 0,1 a 0,5 µg/ml, enquanto que as prototecas mostraram-se, ora suscetíveis (0,5 a 1 µg/ml), ora resistentes (> 100 µg/ml).

MATERIAL E MÉTODOS

Inicialmente, nossos ensaios foram realizados em discos de papel de filtro, contendo 0,1, 1, 10 e 100 µg, sabendo de antemão sua atividade sobre *Candida albicans*. Para este tipo de ensaio, não trabalhamos com *Fissuricella filamenta*, devido à dificuldade de obtenção de suspensão homogênea, em solução fisiológica.

Somente em concentrações muito elevadas, de 100 µg/disco é que conseguimos obter halos de inibição face à *Prototheca wickerhamii* e *P. stagnora*.

A fim de melhor definir os propósitos de nosso trabalho, resolvemos determinar a concentração mínima inibitória do ketoconazol para as seguintes amostras da Micoteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo:

Amostra	Espécie
158	<i>Prototheca zopfii</i>
218	<i>Prototheca zopfii</i>
49	<i>Prototheca wickerhamii</i>
192	<i>Prototheca wickerhamii</i>
442	<i>Prototheca wickerhamii</i>
337	<i>Prototheca stagnora</i>
744	<i>Fissuricella filamenta</i>

A solução estoque de ketoconazol (R. 41.400) foi preparada dissolvendo-se 160 mg da droga pura em 100 ml de álcool a 50%, man-

tida durante 3 horas para esterilização química. A partir desta solução, foram feitas diluições seriadas em água destilada. Para se determinar a concentração mínima inibitória, foram utilizadas duas séries de tubos contendo 4 ml de caldo-Sabouraud. A seguir, foi adicionado 1 ml de cada diluição da droga, obtendo-se, assim, concentrações variando de 320 a 0,31 µg/ml. Foram preparadas suspensões das células dos microrganismos a serem estudados, em solução fisiológica, com opacidade equivalente ao n.º 3 da escala de McFarland. Cada tubo foi semeado com 0,1 ml desta suspensão

e incubado à temperatura ambiente, até os controles mostrarem crescimento abundante (7 dias aproximadamente). As leituras foram realizadas, seguindo-se o seguinte critério:

- 0 = ausência de crescimento
- 1 = crescimento mínimo
- 2 = crescimento moderado
- 3 = crescimento abundante.

A concentração mínima inibitória foi definida como sendo a mais baixa concentração que determinou a inibição do crescimento do microrganismo.

T A B E L A I

Determinação da concentração mínima inibitória do ketoconazol sobre prototecas e *F. filamenta*. Método das diluições em tubo

Prototheca e <i>Fissuricella</i>	Concentração em µg/ml												
	320	160	80	40	20	10	5	2,5	1,25	0,63	0,31	Controle	
<i>P. wickerhamii</i> (49)	0	0	1	1	2	2	2	3	3	3	3	3	
<i>P. wickerhamii</i> (192)	0	0	1	1	1	2	2	2	3	3	3	3	
<i>P. wickerhamii</i> (442)	0	0	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	
<i>P. zopfii</i> (218)	0	0	1	1	1	2	3	3	3	3	3	3	
<i>P. zopfii</i> (158)	0	0	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3	
<i>P. stagnora</i> (337)	0	0	0	1	1	1	1	2	2	3	3	3	
<i>F. filamenta</i> (744)	0	0	0	0	0	0	1	1	1	3	3	3	

0 = ausência de crescimento; 1 = crescimento mínimo
2 = crescimento moderado; 3 = crescimento abundante

RESULTADOS

Os resultados obtidos estão condensados na Tabela I. Verifica-se que somente a *Fissuricella filamenta* sofreu "in vitro" a ação do ketoconazol, na concentração de 10 µg/ml.

Para as prototecas, de modo geral, a concentração mínima inibitória foi de 80 µg/ml para a *P. stagnora* e 160 µg/ml para a *P. wickerhamii* e *P. zopfii*.

CONCLUSÕES

Os Autores estudaram a ação do ketoconazol sobre prototecas e *Fissuricella filamenta*. Este último microrganismo, por várias de suas características, é enquadrado no reino *Fungi*. Quanto às prototecas, sua posição sistemática ainda não se encontra bem definida, acreditando

de AJELLO¹ que as mesmas possam pertencer àquele mesmo reino. Os resultados por nós obtidos mostram que *Fissuricella filamenta*, ao contrário do que se verifica com as prototecas, é bastante sensível ao ketoconazol. Assim, 10 µg/ml da droga inibem seu crescimento, enquanto que, para obter esse mesmo resultado com 3 amostras de *P. wickerhamii*, 2 de *P. zopfii* e uma de *P. stagnora*, foram necessárias concentrações que variavam de 80 a 160 µg/ml.

Face a tais resultados, não se indica a aplicação do ketoconazol no tratamento das prototecoses.

O comportamento "in vitro" da *Fissuricella filamenta*, face a esta droga, é bem diferente do que se observou com as prototecas. Trata-se de mais um argumento para diferenciar *F. filamenta* das prototecas.

Antecedendo a parte experimental do trabalho, os Autores fizeram comentários sobre este novo derivado imidazólico e suas recentes aplicações no tratamento de algumas micoses, superficiais e profundas.

SUMMARY

The in vitro action of ketoconazole on *Prototheca* and *Fissuricella filamenta*

The Authors studied *in vitro* the action of ketoconazole on *Prototheca* and *Fissuricella filamenta*. The minimal inhibitory concentration for this new imidazole derivate was determined.

The results obtained with concentrations in the range of 320 to 0.31 $\mu\text{g/ml}$ showed that only *F. filamenta* was sensitive to ketoconazole in the concentration of 10 $\mu\text{g/ml}$. Such results do not suggest the use of ketoconazole in the treatment of protothecosis.

Perhaps a suggestive conclusion in taxonomy is that the behavior *in vitro* of *Fissuricella filamenta* to this drug is quite different as compared to the other *Prototheca*. It is one more argument to differentiate *F. filamenta* from *Prototheca*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. AJELLO, L. — Medically important infectious fungi. *Contr. Microbiol. Immunol.* 3: 7-19, 1977.

2. BAKER, R. D. — *Human Infections with Fungi, Actinomycetes and Algae*. New York, Springer Verlag, 1971.
3. CAMARGO, Z. P. — *Algas do gênero Prototheca: características microbiológicas e imunológicas*. [Tese de doutoramento]. São Paulo, 1978.
4. EMMONS, C. W.; BINFORD, C. A.; UTZ, J. P. & KWONG-CHUNG, K. J. — *Medical Mycology*. 3rd edition. Philadelphia, Lea & Febiger, 1977.
5. HAZEN, E. L.; GORDON, M. A. & REED, F. C. — *Laboratory Identification of Pathogenic Fungi Simplified*. 3rd edition. Springfield, Charles C. Thomas, 1970.
6. LACAZ, C. da S. — *Micologia Médica*. 6.ª edição. São Paulo, Sarvier, 1977.
7. PORE, R. S.; D'AMATO, R. F. & AJELLO, L. — *Fissuricella* gen. nov.: a new taxon for *Prototheca filamenta*. *Sabouraudia* 15: 69-78, 1977.
8. RIPPON, J. W. — *Medical Mycology. The pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*. Philadelphia, W. B. Saunders, 1974.
9. SEGAL, E.; PADHYE, A. A. & AJELLO, L. — Susceptibility of *Prototheca* species to antifungal agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* 10: 75-79, 1976.
10. SYMOENS, J. — Ketoconazole in the treatment of dermatomycoses and systemic mycotic infections. *Roy. Soc. Med. Int. Cong. Symp. Ser.* 24: 129-132, 1980.
11. VOLCAN G., S. — *Protothecosis. Nuevo problema en Medicina*. [Tese para Professor Agregado]. Escuela de Medicina, Universidad de Oriente, Ciudad Bolívar, 1978.

Recebido para publicação em 4/8/1980.