

AÇÃO *IN VITRO* DA AUREOMICINA ORAL E DO FOSFATO BICÁLCICO SÔBRE O CRESCIMENTO DE *CANDIDA ALBICANS*.

por

JOSÉ LOPES NETTO
Médico do Instituto Adolfo Lutz

ROBERTO DE ALMEIDA MOURA
Médico do Instituto Adolfo Lutz

LÚCIO P. DE CARVALHO LIMA
Livre-docente da Faculdade de Farmácia e Odontologia da Universidade de São Paulo

Desde o aparecimento da aureomicina como agente terapêutico, têm sido registradas manifestações durante a sua administração, principalmente para o lado do tracto gastrintestinal. As manifestações orais (língua negra-pilosa, estomatite angular, glossite, etc.) aparecem em 6 a 20% dos pacientes tratados pela aureomicina e o cloranfenicol (TOMASZEWSKI e colab., 1951). São também freqüentes diarréia, prurido e fissura anais, bem como irritação vaginal, etc. Ao lado destas, são referidas complicações mais graves, como sejam processos pulmonares (WOODS e colab., 1951), endocardites (GEIGER e colab., 1946 e ZIMMERMAN, 1950), ocasionando, em alguns casos, a morte do paciente.

A freqüência com que se conseguiu isolar, desses casos, *Candida albicans*, levou a crer que essa levedura era favorecida, em seu crescimento, pelo antibiótico (MOORE, 1951 e PAPPENFORT e SCHNALL, 1951). Esses autores referem ter obtido, *in vitro*, estimulação do crescimento de *Candida albicans*, em presença de aureomicina.

É opinião de outros autores que as manifestações clínicas devam ser atribuídas a uma deficiência de complexo B (LEITNER, 1950 e HARRIS, 1950). Este último admite que a aureomicina, reduzindo a flora bacteriana normal do intestino, possibilitaria um grande desenvolvimento das leveduras normalmente existentes, as quais ganhariam virulência e invadiriam os tecidos cuja resistência estaria diminuída pela deficiência de vitamina B.

Por outro lado, LIPNIK e colab. (1952) referem ter demonstrado, *in vitro*, ser o fosfato bicálcico, contido no excipiente da cápsula do antibiótico, o responsável pela estimulação. Empregando discos embebidos em solução de fosfato bicálcico e em aureomicina oral, encontraram zonas de aumento do crescimento da levedura, em placa.

O problema, sendo grave, devido ao largo emprêgo da droga, mereceu a atenção do COUNCIL ON PHARMACY AND CHEMISTRY (1951), que exigiu

do laboratório fabricante a inclusão de uma advertência a respeito, no rótulo do medicamento.

Procuramos, no presente trabalho, verificar a possível ação estimuladora da aureomicina oral e do fosfato bicálcico sobre o crescimento da levedura, empregando leitura turbidimétrica e procedendo à análise estatística dos resultados.

MATERIAL E MÉTODOS

Foi utilizada u'a amostra de *Candida albicans* recentemente isolada de material de traquéia, colhido por endoscopia, patogênica para o coelho, determinando morte em quatro dias e característicos microabscessos renais e pulmonares.

O meio empregado foi caldo maltosado (Maltose broth, Difco), com pH 4,0, uma vez que a aureomicina inativa-se facilmente em pH elevado (LEVADITI e colab., 1950). Sendo a atividade do antibiótico sensivelmente diminuída a 37°C (PRATT e DUFRENOY, 1949), as incubações foram procedidas a 24°C.

As leituras turbidimétricas foram realizadas em espectrofotômetro "Coleman Junior", empregando-se cubas Pyrex de 18 x 150 mm, previamente testadas contra cubas padrão. Foi determinada, inicialmente, a curva de absorção espectrofotométrica do meio, com a finalidade de determinar a faixa de comprimento de onda correspondente à transmissão máxima, o que se verificou entre 670 e 690 m μ . Todas as leituras foram feitas em 680 m μ , contra blanche do meio.

Foi utilizada aureomicina "Lederle" para uso oral, dissolvida em água destilada estéril, as soluções sendo preparadas no momento do início da experiência, de modo a obterem-se, nos tubos de cultura, concentrações de 2 e 4 gamas por ml, correspondentes às concentrações médias sanguíneas obtidas pelas doses terapêuticas habituais (BARON, 1950 e KAREL e ROACH, 1951). A atividade do antibiótico contido nos tubos de experiência foi verificada por meio de discos de papel de filtro embebidos nos meios não semeados, frente a uma raça sensível de *Bacillus subtilis*.

Como inóculo usou-se uma cultura de 15 horas da *Candida albicans* em caldo maltosado, cuja transmissão, no momento da semeadura, era de 54% (Coleman Junior, $\lambda = 680$ m μ , tubos 18 x 150).

EXPERIÊNCIA N.º 1

Comparamos o crescimento, em 12 horas, de *Candida albicans* em meio simples e em meio adicionado de aureomicina oral.

Procuramos verificar, previamente, qual o tempo de atividade da aureomicina em solução no meio de cultura, testando-a de hora em hora; o período em que houve manutenção da atividade foi 15 horas, tempo suficiente para manifestar-se a eventual ação sobre a reprodução da levedura.

Os dados da experiência vêm expostos no quadro 1.

QUADRO 1

Tubos	Meio	Sol. aureomicina		Água destil.	Inóculo
		20γ/ml	40γ/ml		
1 a 10	8,5 ml	—	—	1,0 ml	0,5 ml
11 a 20	8,5 ml	1,0 ml	—	—	0,5 ml
21 a 30	8,5 ml	—	1,0 ml	—	0,5 ml
Blanque	8,5 ml	—	—	1,5 ml	—

Para o estudo dos resultados, procedemos à análise da variância das médias dos três grupos pelo teste F, estabelecendo a hipótese de que todos os valores pertencem a u'a mesma população de crescimentos, com distribuição normal. Os cálculos estão expressos no quadro 2.

QUADRO 2

GRUPOS	I (meio simples)	II (aureomic. 2γ/ml)	III (aureomic. 4γ/ml)	
LEITURAS (Turvação% = 100% — Transmissão%)	20,0	24,0	24,0	
	21,5	25,0	24,0	
	22,0	24,5	26,5	
	22,0	25,5	23,0	
	23,5	26,0	22,0	
	22,5	21,0	22,0	
	27,0	27,5	26,0	
	22,0	26,5	25,0	
	27,0	25,5	22,5	
	21,0	26,0	27,0	
Sk = 30 SX ² = 17512,5 SX = 722,0 C = (SX) ² /Sk = 17376,13	Sk ₁ = 10 SX ₁ = 228,5	Sk ₂ = 10 SX ₂ = 251,5	Sk ₃ = 10 SX ₃ = 242,0	
Soma total dos quadrados = S(X — \bar{x}) ² = SX ² — C = 136,3667 (1)				
Soma dos quadrados entre os grupos = SX ² ₁ /k ₁ + SX ² ₂ /k ₂ + SX ² ₃ /k ₃ — C = 26,7167 (2)				
Soma dos quadrados dentro dos grupos = (1) — (2) = 109,65				
Fonte de Variação	Varição	Graus de liberdade	Variância	F
TOTAL ENTRE DENTRO	136,3667 26,7167 109,65	Sk — 1 = 30 — 1 = 29 n — 1 = 3 — 1 = 2 Sk — n = 30 — 3 = 27	26,7167/2 = 13,3583 109,65/27 = 4,0611	$\frac{13,3583}{4,0611} = 3,29$

QUADRO 4

GRUPOS	I (meio simples)			II (fosfato)		
	X_1	$X_1 - \bar{m}_1$	$(X_1 - \bar{m}_1)^2$	X_2	$X_2 - \bar{m}_2$	$(X_2 - \bar{m}_2)^2$
VALORES	33,0	0	0	27,0	8,0	64,0
	31,5	1,5	2,25	33,0	2,0	4,0
	29,5	3,5	12,25	38,0	3,0	9,0
	32,5	0,5	0,25	35,0	0	0
	32,0	1,0	1,0	37,0	2,0	4,0
	33,5	0,5	0,25			
	33,5	0,5	0,25			
	30,5	2,5	6,25			
	31,0	2,0	4,0			
	32,0	1,0	1,0			
\bar{x}	$\bar{x}_1 = 31,9$			$\bar{x}_2 = 34,0$		
k	$k_1 = 10$			$k_2 = 5$		
\bar{m}	$\bar{m}_1 = 33,0$			$\bar{m}_2 = 31,0$		
$S(X - m)^2$	27,5			81,0		
$C = k(\bar{x} - \bar{m})^2$	12,4			5,0		
$S(X - x)^2 = S(X - \bar{m})^2 - C$	15,4			76,0		
$S^2 = \frac{S(X_1 - \bar{x}_1)^2 + S(X_2 - \bar{x}_2)^2}{(k_1 - 1) + (k_2 - 1)}$	91,4			7,03		
$s = \frac{\bar{x}_2 - \bar{x}_1}{s} \sqrt{\frac{k_1 k_2}{k_1 + k_2}}$	$\sqrt{7,03} = 2,65$			1,44		

O valor de F para, respectivamente, 2 e 27 graus de liberdade é 3,35, ao nível de significância de 5%. O valor achado — 3,29 — não é significativo, a hipótese não sendo rejeitada.

Não há, pois, evidência de que a aureomicina tenha influído sobre o crescimento de *Candida albicans*.

EXPERIÊNCIA N.º 2

Comparamos o crescimento, em 24 horas, de *Candida albicans* em meio simples e em meio adicionado de fosfato bicálcico na concentração de 0,5%, segundo a técnica já descrita.

Os resultados das leituras (expressas em Turvação % = 100% — Transmissão%) foram os seguintes :

Caldo maltosado.....	33,0 — 31,5 — 29,5 — 32,5 — 32,0
	33,5 — 33,5 — 30,5 — 31,0 — 32,0
Caldo maltosado fosfatado.....	27,0 — 33,0 — 33,0 — 35,0 — 37,0

Estabelecendo a hipótese de que não há diferença entre os dois grupos de valores obtidos, pertencendo êles a u'a mesma população de crescimentos, procedeu-se à análise pelo teste *t*, como se vê no quadro 4.

O valor de *t* para 13 graus de liberdade, ao nível de 5%, é 2,16. O valor achado não é significativo para rejeitar a hipótese estabelecida.

CONCLUSÕES

Do estudo estatístico apresentado acima, concluímos não ter sido evidenciada ação estimuladora, quer da aureomicina, quer do fosfato bicálcico, sobre o crescimento da levedura.

RESUMO

Os autores procuraram verificar a influência da aureomicina oral e do fosfato bicálcico, constituinte normal do excipiente das cápsulas daquele antibiótico, sobre o crescimento da levedura *Candida albicans*. Não foi evidenciada, pela análise estatística dos resultados, ação estimuladora do crescimento.

SUMMARY

The authors have studied the influence of oral aureomycin and the normal component of its capsules, bicalcium phosphate, on the growth of *Candida albicans*. Statistical analysis of results showed no evidence of growth stimulation.

BIBLIOGRAFIA

- BARON, A. L. — Handbook of antibiotics. New York, Reinhold Publishing Corporation, 1950; p. 63.
- COUNCIL ON PHARMACY AND CHEMISTRY — 1950 — Warning statement to be included in aureomycin hydrochloride, chloramphenicol and terramycin hydrochloride labeling. *J.A.M.A.* **145**: 1267.
- GEIGER, A. J., H. A. WENNER, H. D. AXELROD e S. H. DURLACHER — 1946 — Mycotic endocarditis and meningitis. Case report due to *Monilia albicans*. *Yale J. Biol. Med.* **13**: 259-268. Citado por M. J. Lipnik e colab. in *J. Invest. Dermat.* **18**: 247-260, 1952.
- HARRIS, H. J. — 1950 — Aureomycin and chloramphenicol in brucellosis. *J.A.M.A.* **142**: 161-165.
- KAREL, L. e E. S. ROACH — A dictionary of antibiotics. New York, Columbia University, 1951; p. 27-29.
- LEITNER, Z. A. — 1950 — Vitamin deficiency and antibiotics. *Brit. Med. J.* **1**: 491-492.
- LEVADITI, C., A. VAISMAN, J. HENRY-EVENO e J. VEILLET — Antibiotiques d'origine fongique, bactérienne ou végétale. Paris, Baillière, 1950; p. 108.
- LIPNIK, M. J., A. M. KLIGMAN e R. STRAUSS — 1952 — Antibiotics and fungus infections. *J. Invest. Dermat.* **18**: 247-260.
- MOORE, M. — 1951 — In vivo and in vitro effect of aureomycin hydrochloride on *Syngospora* (*Monilia*, *Candida*) *albicans*. *J. Lab. Clin. Med.* **37**: 703-712.
- PAPPENFORT, R. B. e E. S. SCHNALL — 1951 — Moniliasis in patients treated with aureomycin. *Arch. Int. Med.* **88**: 729-735.
- PRATT e DUFRENOY — Antibiotics. Philadelphia, Lippincott, 1949. Citado in Council of the Pharmaceutical Society of Great Britain — Antibiotics, London, The Pharmaceutical Press, 1952; p. 233.
- TOMASZEWSKI, T. e M. D. POZNAM — 1951 — Side effects of chloramphenicol and aureomycin, with special reference to oral lesions. *Brit. Med. J.* **1**: 388-392.
- WOODS, J. W., I. H. MANNING JR. e C. N. PATTERSON — 1951 — Monilial infections in the therapeutic use of antibiotics. *J.A.M.A.* **145**: 207-211.
- ZIMMERMAN, L. E. — 1950 — *Candida* and *aspergillus* endocarditis. *Arch. Pathology* **50**: 591-605.