



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Yuliana Del Pilar Vega Chacón

**Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito
fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo**

Araraquara

2018



UNESP - Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Odontologia de Araraquara



Yuliana Del Pilar Vega Chacón

**Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito
fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo**

Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Odontologia, Araraquara para obtenção do título de Mestre em Reabilitação Oral na área de Prótese.

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

Araraquara

2018

Vega Chacón, Yuliana del Pilar

Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo / Yuliana del Pilar Vega Chacón. -- Araraquara: [s.n.], 2018
75 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado em Reabilitação Oral) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia

Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

1. Proteínas de membrana transportadoras 2. Candidíase 3. Resistência microbiana a medicamentos 4. Antifúngicos
5. Fotoquimioterapia I. Título

Yuliana Del Pilar Vega Chacón

**Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito
fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo**

Comissão julgadora

Dissertação apresentada para a obtenção do grau de mestre em Reabilitação Oral -
área de Prótese

Presidente e Orientador: Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima

2º Examinador: Profa. Dra. Livia Nordi Dovigo

3º Examinador: Prof. Dr. Clovis Wesley Oliveira de Souza

Araraquara, 06/08/2018

DADOS CURRICULARES

Yuliana Del Pilar Vega Chacón

NASCIMENTO: 04/02/1989 – Lima, Perú
FILIAÇÃO: Benjamín Vicente Vega Avellaneda
Nidia Fanny Chacón Hinostrosa
2007 a 2013: Curso de Graduação pela Facultad de Odontologia Universidad
Alas Peruanas (Perú)
2016 a 2018: Curso de Pós-Graduação em Reabilitação Oral, Área de
concentração em Prótese, nível de Mestrado, pela Faculdade de
Odontologia de Araraquara – UNESP

Dedico o presente trabalho a Deus por abençoar-me sempre

Aos meus pais, **Benjamín Vega** e **Nidia Chacón**, por todo sacrifício que eles fizeram para dar-me o melhor sempre, me apoiando nos momentos mais difíceis e por todo seu amor mesmo na distância.

Ao meu irmão, **Jaime Vega**, sempre me apoiando e animando para continuar nesta luta do mestrado e por ser sempre um amigo para mim e a pessoa que admiro.

Aos meus cachorros **Saza, Bronco e Pelusa** por todo o amor que eles têm por mim, sempre estão no meu coração.

AGRADECIMENTOS

Ao Brasil e à Faculdade de Odontologia de Araraquara, por me dar a oportunidade de fazer o mestrado.

Ao programa de pós-graduação em Reabilitação Oral, em especial à **Profa. Dra. Ana Cláudia Pavarina**, por me dar a oportunidade de realizar o mestrado aqui no Brasil.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Ewerton Garcia de Oliveira Mima**, um verdadeiro exemplo de pesquisador e professor e por acreditar em meu potencial como aluno de pós-graduação. Agradeço toda paciência principalmente com o idioma e toda a ajuda que me deu durante este tempo.

Aos meus amigos **Midian Castillo** e **Elkin Florez** por todos os momentos de alegria, paciência, parceria e companhia.

A **Bruna Michelli Novelli**, muito obrigada amiga por toda sua ajuda no laboratório e sobre tudo pela paciência.

Ao grupo de pesquisa, **Jefferson, Vinicius, Thaís e Gabriela**, obrigada por toda a paciência, todos os ensinamentos e disposição em me ajudarem com as pesquisas.

A CAPES, **pela bolsa concedida no** Programa de Pós-graduação de Reabilitação Oral, que apoiou o desenvolvimento dessa pesquisa

Vega Chacón YDP. Susceptibilidade de *Candida albicans* resistente a fluconazol ao efeito fotodinâmica e inibidores dos sistemas de efluxo [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

RESUMO

Um dos principais mecanismos de resistência microbiana são os sistemas de efluxo, que transportam medicamentos antimicrobiano para fora da célula. A eficácia de alguns agentes de inibição dos sistemas de efluxo tem sido reportada para reverter a resistência microbiana e também para potencializar as terapias antimicrobianas. Além disso, métodos alternativos aos agentes antimicrobianos convencionais têm sido investigados, como a Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT). O objetivo desse estudo foi avaliar in vitro o efeito da aPDT e de dois inibidores de sistemas de efluxo microbiano (curcumina e verapamil) na resistência à inativação de *C. albicans*. Foram utilizadas duas cepas de *C. albicans*, uma susceptível (CaS) e outra resistente (CaR) a fluconazol. Os parâmetros de inativação fúngica foram determinados submetendo-se culturas planctônicas de ambas as cepas à curcumina, ao verapamil, ao fluconazol e também à aPDT (mediada pela curcumina 40 μM (14,73 $\mu\text{g/mL}$) e luz de LED azul de $\approx 455\text{ nm}$ a 5,28 J/cm²). As duas cepas foram cultivadas e tratadas associando-se os agentes de inibição do efluxo ao fluconazol em concentrações não letais. Os dados de UFC/mL foram analisados pelos testes paramétricos t de Student, ANOVA/Welch e *post-hoc* de Games-Howell e pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney ($\alpha=0,05$; $n=12$). Os resultados demonstraram que aPDT promoveu uma redução significativa ($p<0,001$) de 4,5 e 4,42 $\log_{10}$ para CaS e CaR, respectivamente. Para CaS, os valores de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) de fluconazol, curcumina e verapamil foram de 0,5 $\mu\text{g/mL}$, 20 μM (7,37 $\mu\text{g/mL}$) e 4 mg/mL (4.000 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente; as quais promoveram reduções $\geq 1,4 \log_{10}$ nas concentrações $\geq \text{CIM}$ ($p\leq 0,045$). Para CaR, fluconazol e verapamil apresentaram valores de CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ e 4 mg/mL (4.000 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente; a curcumina não reduziu a viabilidade de CaR, ao passo que redução significativa $\geq 1,74 \log_{10}$ foram observadas para verapamil e fluconazol $\geq \text{CIM}$ ($p<0,001$). A associação sub-CIM de verapamil + fluconazol de 2 mg/mL (2.000 $\mu\text{g/mL}$) + 0,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para CaS e 2 mg/mL (2.000 $\mu\text{g/mL}$) + 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para CaR mostrou uma redução ($p<0,001$) maior para CaR de 4,08 $\log_{10}$ em comparação com CaS ($p<0,001$, 0,59 $\log_{10}$). A associação de curcumina + fluconazol de 10 μM (2,68 $\mu\text{g/mL}$) + 0,25 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para CaS e 40 μM (14,73 $\mu\text{g/mL}$) + 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para CaR promoveu redução maior para CaR ($p<0,001$) de 2,28 $\log_{10}$ do que para CaS ($p<0,001$) de 1,58 $\log_{10}$. A associação de curcumina, verapamil e fluconazol nessas mesmas concentrações resultou em uma redução ($p<0,001$) de 0,77 $\log_{10}$ para CaS e de 2,86 $\log_{10}$ e para CaR. Concluiu-se que a aPDT reduziu tanto a viabilidade de CaS como a de CaR. O verapamil e a curcumina reverteram a resistência de *C. albicans* ao fluconazol em culturas planctônicas, tendo um efeito inibitório maior para CaR do que para CaS.

Palavras chaves: Proteínas de membrana transportadoras. Candidíase. Resistência microbiana á medicamentos. Antifúngicos. Fotoquimioterapia.

Vega Chacón YDPV. Susceptibility of fluconazole-resistant *Candida albicans* to photodynamic effect and inhibitors of efflux systems [Dissertação de Mestrado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2018.

ABSTRACT

One of the major mechanisms of microbial resistance is the efflux systems, or efflux pumps, present in the plasma membrane of microorganisms that carry an antimicrobial drug out of the cell. The efficacy of some inhibitors of efflux systems has been reported to reverse microbial resistance, including *C. albicans*, and also to potentiate antimicrobial therapies. In addition, alternative methods to conventional antimicrobial agents have been investigated, such as antimicrobial Photodynamic Therapy (aPDT). The objective of this study was to evaluate in vitro the effect of aPDT and two inhibitors of microbial efflux systems (curcumina and verapamil) on the resistance to inactivation of *C. albicans*. For this, two strains of *C. albicans*, one susceptible (CaS) and another resistant (CaR) to fluconazole were used. Fungal inactivation parameters were determined by subjecting planktonic cultures of both strains to curcumina, verapamil, fluconazole, and also aPDT (mediated by curcumin at 40 μ M (14.73 μ g/mL) and blue LED light of $\cong$ 455 nm and 5.28 J/cm²). These strains were then cultured and treated associating one of the efflux inhibitors with fluconazole using non-lethal concentrations. For the statistical analysis, the normality and the homogeneity of variances were evaluated by the Shapiro-Wilk and Levene tests, respectively. Data were analyzed by Student's t-tests, Welch-corrected ANOVA and Games-Howell post-hoc and Mann-Whitney non-parametric test (α = 0.05) (n = 12). aPDT promoted a significant reduction ($p < 0.001$) of 4.5 log₁₀ for CaS and 4.42 log₁₀ for CaR. For CaS, the values of Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) of fluconazole, curcumin and verapamil were 0.5 μ g/mL, 20 μ M (7.37 μ g/mL) and 4 mg/mL (4000 μ g/mL), respectively; which promoted reductions of ≥ 1.4 log₁₀ at concentrations $\geq$ MIC ($p \leq 0.045$). For CaR, fluconazole and verapamil showed MIC values of 128 μ g/mL and 4 mg/mL (4000 μ g/mL), respectively; curcumin did not reduce the viability of CaR, whereas significant reduction ≥ 1.74 log₁₀ were observed for verapamil and fluconazole at $\geq$ MIC ($p < 0.001$). The association of verapamil + fluconazole at sub-MIC of 2 mg/mL (2000 μ g/mL) + 0.25 μ g/mL, respectively, for CaS, and 2 mg/mL (2000 μ g/mL) + 64 μ g/mL, respectively, for CaR showed higher reduction ($p < 0.001$) for CaR of 4.08 log₁₀ compared to CaS ($p < 0.001$; 0.59 log₁₀). The association of curcumin + fluconazole at 10 μ M (3.68 μ g/mL) + 0.25 μ g/mL, respectively, for CaS and at 40 μ M (14.73 μ g/mL) + 64 μ g/mL, respectively, for CaR promoted higher reduction for CaR ($p < 0.001$) of 2.28 log₁₀ than for CaS ($p < 0.001$) of 1.58 log₁₀. The association of curcumin, verapamil, and fluconazole at the same concentrations showed reduction ($p < 0.001$) of 0.77 log₁₀ for CaS and 2.86 log₁₀ for CaR. In conclusion, aPDT significantly reduced the viability of CaS and CaR. Verapamil and curcumin reversed the resistance of *C. albicans* to fluconazole in planktonic cultures, having a higher inhibitory effect for CaR than CaS.

Keywords: Membrane transport proteins. Candidiasis. Drug resistance, microbial. Antifungal agents. Photochemotherapy.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
°C	Graus Célsius
µg	<i>Microgramas</i>
µL	Microlitro
aPDT	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
CaR	<i>Candida albicans</i> resistente
CaS	<i>Candida albicans</i> susceptível
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm ²	Centímetro quadrado
CUR	Curcumina
DMSO	Dimetilsulfóxido
FLU	Fluconazol
FS	Fotossensibilizador
h	Horas
J	Joules
LED	Luz emitida por Diodo
M	Molar
mg	miligramas
mL	mililitros
mW	miliWatts
nm	Nanômetro
Rpm	Rotações por minuto
u.a.	unidades arbitrárias
UFC	Unidades Formadora de Colônias
VER	Verapamil
Log	logarítmico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 PROPOSIÇÃO	17
3 REVISÃO DA LITERATURA	18
3.1 Candidíase	18
3.2 Sistema de Efluxo – Inibidores de Sistema de Efluxo.....	21
3.3 Curcumina e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)	31
4 MATERIAL E MÉTODO	37
4.1 Material	37
4.1.1 Material de consumo.....	37
4.1.2 Instrumentais.....	38
4.1.3 Equipamentos.....	38
4.2 Métodos.....	39
4.2.1 Preparo dos fármacos.....	39
4.2.2 Fonte de luz	40
4.2.3 Micro-organismos, Condições de Cultivo e Desenvolvimento de Culturas Planctônicas.....	41
4.2.4 Toxicidade de DMSO	43
4.2.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)	43
4.2.6 Contagem do número de colônias viáveis	44
4.2.7 Teste de susceptibilidade.....	45
4.2.8 Inibição de sistemas de efluxo.....	47
4.3 Análise Estatística	49
5 RESULTADOS.....	50
5.1 Toxicidade de DMSO.....	50
5.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana	50

5.3 CIM e CFM de Fluconazol, Verapamil e Curcumina.....	51
5.4 Inibição de sistemas de efluxo.....	54
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	62
REFERÊNCIAS	63
APÊNDICE.....	69

1 INTRODUÇÃO

A candidíase bucal é a infecção fúngica mais comum que acomete os humanos e cujo principal fator etiológico são os fungos do gênero *Candida*, sendo *Candida albicans* a espécie mais prevalente¹. Os fatores de risco para essa infecção incluem o uso de próteses dentárias, antibióticos, medicamentos imunossupressores e também condições sistêmicas, como diabetes, deficiências nutricionais e câncer². *C. albicans* é um fungo oportunista que tem como fator de virulência a capacidade de alterar sua morfologia de levedura (forma inerte) para forma filamentosa de hifas ou pseudohifas (invasiva, infecciosa), conhecida como polimorfismo³. Além disso, antes do surgimento dos antiretrovirais, a candidíase bucal já foi considerada uma indicadora do desenvolvimento de Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), por afetar cerca de 90% dessa população⁴. Tem sido demonstrado que acima de 90% dos casos de fungemia são atribuídos às espécies de *Candida*, e que o número de mortes como resultado dessa infecção varia de 40% a quase 80% em pacientes imunossuprimidos^{5,6,7}.

O tratamento convencional da candidíase bucal envolve a utilização de medicamentos tópicos ou sistêmicos. Os medicamentos mais utilizados são os polienos (nistatina, anfotericina B), que alteram a permeabilidade da membrana fúngica, e os azóis que inibem a biossíntese de ergosterol, os quais podem ser divididos em imidazólicos (clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazólicos (fluconazol e itraconazol)⁸⁻¹¹. Existe também a classe de antifúngicos equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), os quais inibem a síntese do β -1,3 glucano da parede celular fúngica¹¹. Os agentes tópicos, apesar de serem muitas vezes efetivos, têm sua concentração reduzida a valores subterapêuticos devido aos efeitos diluentes da saliva e à ação de limpeza da musculatura bucal. Já os medicamentos sistêmicos podem promover efeitos colaterais hepatotóxicos e/ou nefrotóxicos^{12,13}, o que requer muita cautela em sua prescrição. Além disso, o uso indiscriminado dos agentes antifúngicos tem levado ao desenvolvimento de cepas resistentes.

Clinicamente, a resistência aos antifúngicos é um conceito que descreve a falha de uma terapia antifúngica que resulta na persistência ou progressão da infecção¹³. Em termos laboratoriais, a resistência antifúngica é determinada pela Concentração

Inibitória Mínima (CIM), em que o crescimento do micro-organismo é mensurado por uma série de concentrações do agente antimicrobiano ao longo de um período de tempo definido de acordo com protocolos padrões¹⁴. A menor concentração do medicamento que inibe o crescimento microbiano, geralmente em 50% ou 90%, é definido como CIM. Atualmente, a resistência microbiana é uma ameaça mundial e uma das maiores preocupações da área da saúde⁸.

Embora a resistência de *C. albicans* aos agentes polienos seja rara³ muitos mecanismos de resistência aos azóis têm sido reportados, como mutações genéticas que promovem alterações no alvo da droga, superexpressão de transportadores multidrogas da membrana plasmática (também denominada bombas de efluxo) e sinalização de vias de respostas ao estresse celular^{3,13,15}. As bombas de efluxo ou sistemas de efluxo microbiano transportam de maneira ativa substâncias tóxicas para fora da célula e têm sido amplamente reconhecidos como os principais mecanismos de resistência microbiana a muitas classes de antimicrobianos^{3,16}. Esses sistemas de efluxo são, na verdade, sistemas de transporte celulares responsáveis pela comunicação da célula com o meio ambiente, permitindo a captação de nutrientes e íons essenciais à célula como também a excreção de produtos finais do metabolismo e substâncias tóxicas à célula¹⁷. Existem duas principais classes de sistemas de efluxo microbiano da membrana plasmática que são clinicamente importantes: as classes de transportadores dependentes de energia, ou super-família de transportadores ABC (do inglês *ATP-binding cassette*), e a classe de transportadores ou super-família de maiores facilitadores (do inglês *MFS, major facilitator superfamily*)¹⁸. Foram identificados 28 genes associados a 28 proteínas pertencentes à classe de transportadores ABC, e 95 genes e proteínas dos transportadores MFS dos quais somente 2 (dois) estão relacionados ao efluxo de drogas^{19,20}. Entretanto somente os transportadores ABC Cdr1p e Cdr2p e o transportador MFS Mdr1p são os principais responsáveis pela resistência aos azóis^{18,21}. Apesar da importância desses sistemas de transportes para a viabilidade celular, a superexpressão desses sistemas acarreta em resistência microbiana.

Devido aos problemas apresentados pelos tratamentos atualmente disponíveis, alternativas antimicrobianas têm sido pesquisadas, como a Terapia Fotodinâmica (do inglês, *Photodynamic Therapy* ou PDT)^{22,23} que utiliza a associação de um agente

fotossensibilizador (FS) a uma fonte de luz de comprimento de onda adequado. A interação entre o FS e a luz na presença do oxigênio resulta na produção de espécies reativas tóxicas, principalmente o oxigênio singlete, e radicais livres que promovem dano e morte celulares^{23,24,25}. Historicamente, a associação de substâncias químicas e luz foi relatada no final do século XIX por Oscar Raab, o qual investigou o efeito antimicrobiano dos corantes eosina e acridina, na presença de luz, sobre *Paramecium caudatu*²⁵, e hoje a PDT tem sido utilizada no tratamento de câncer como um método de inativação de células neoplásicas²⁶. Os primeiros FS utilizados (derivados da porfirina e corantes fenotiazínicos, como azul de toluidina e azul de metileno) são conhecidos como FS de primeira geração. Com intuito de se aumentar a eficácia da aPDT, FS mais recentes, conhecidos como de segunda e terceira geração, têm sido investigados, como as ftalocianinas²⁷ e clorinas²⁸. Além disso, compostos naturais como a curcumina tem mostrado um grande potencial de aplicação para fotoinativação fúngica, inclusive de *C. albicans*^{29,30}. A curcumina é um composto fenólico (diferulometano) de baixo peso molecular isolado dos tubérculos da *Curcuma longa* L. e um dos componentes presente no açafrão. Tem sido demonstrado que, isoladamente, a curcumina já apresenta efeito antifúngico contra *C. albicans*³¹, e estudos recentes verificaram que esse efeito é potencializado quando a curcumina é utilizada como FS associada à luz^{29,30}.

Algumas abordagens têm sido propostas para enfrentar a resistência às drogas antimicrobianas mediada pelos sistemas de efluxo, as quais incluem: uso de drogas antifúngicas que não são substratos dos sistemas de efluxo (como equinocandinas), inibição do suprimento de energia e inibição farmacológica direta dos sistemas de efluxo^{32,33,34}. Alguns estudos demonstraram que determinadas substâncias podem ser usadas para inibir as bombas de efluxo presentes na membrana plasmática fúngica, como a própria curcumina³⁵ e também verapamil^{34,36}, ibuprofeno³⁷, farnesol³⁸, monoterpenos (timol e carvacrol)³⁹, FK506⁴⁰, unarmicinas A e C⁴¹, derivados de chalcona⁴², disulfiram⁴³ e algumas milbemicinas⁴⁴. Um desses inibidor do sistema de efluxo microbiano que tem sido bastante investigado é o verapamil, um bloqueador dos canais de cálcio pertencente à classe fenilaquilamina utilizado no tratamento de hipertensão⁴⁵ e angina pectoris⁴⁶, que tem sido empregado também para inibição das bombas de efluxo de espécies bacterianas³².

Assim, verifica-se que a utilização de inibidores dos sistemas de efluxo e a aPDT são métodos potenciais para o combate da resistência fúngica. Portanto, as hipóteses do presente estudo consideram que cepas de *C. albicans* susceptível e resistente à fluconazol (1) possam apresentar diferente susceptibilidade à aPDT mediada pela curcumina, e que (2) a utilização de inibidores dos sistemas de efluxo (curcumina e verapamil) possam potencializar a ação antifúngica do fluconazol e reverter a resistência fúngica.

2 PROPOSIÇÃO

O objetivo geral deste estudo foi avaliar in vitro o efeito de métodos alternativos no combate à resistência de *C. albicans*. Os objetivos específicos deste estudo foram:

1. Comparar a susceptibilidade de cepas de *C. albicans* susceptível e resistente ao fluconazol em culturas planctônicas à aPDT mediada pela curcumina como agente fotossensibilizador e luz de LED azul ($\cong 455$ nm).
2. Verificar se os inibidores de sistemas de efluxo (curcumina e verapamil) podem potencializar a ação antifúngica do fluconazol em culturas planctônicas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Candidíase

Costerton et al⁴⁷. (1999) realizaram uma revisão de literatura sobre biofilmes bacterianos. As infecções agudas quase sempre podem ser tratadas eficazmente com antibióticos, exceto infecções de cepas resistentes aos antibióticos. O biofilme se desenvolve preferencialmente em superfícies inertes, ou sobre tecido mortos, produzindo-se sobre dispositivos médicos e também sobre tecidos vivos. Os antibióticos reverterem os sintomas causadas por células planctônicas, mas não matam os biofilmes. Uns dos mecanismos da resistência aos agentes microbianos em biofilme é a falha dos agentes para penetrar por completo o biofilme. Outra possível causa é que algumas células apresentam limitação de nutrientes, o que as faz crescerem lentamente ou num estado de escassez, o que faz com que não sejam muito susceptíveis aos antimicrobianos. A terceira hipótese é que, ao menos, algumas das células do biofilme adquirem um fenótipo de biofilme distinto com uma resposta biológica programada para crescimento em superfície. Concluiu-se que o biofilme representa um conjunto microbiano com seus próprios sistemas de defensas e comunicação. Os avanços recentes sobre biofilme têm como objetivo desenvolver agentes terapêuticos que podem proporcionar um controle efetivo das infecções por biofilme.

As infecções fúngicas são um problema crescente no ambiente hospitalar. Em 2000, Costa et al⁶. fizeram um estudo prospectivo com 86 pacientes hospitalizados com fungemia durante um período de 2 anos. Para isso, realizaram técnicas microbiológicas de hemocultura. Duas ou mais amostras de hemocultura foram positivas em 81% dos pacientes. As principais condições/enfermidades associadas a fungemia foram: cirrose e cirurgias abdominais (28%); condições hematológicas (leucemia, linfoma e transplante de medula óssea) (17%); imunossupressão (lupus, AIDS e câncer) (13%); prematuridade (11%), enfermidade neurológica (trauma e câncer) (11%); queimaduras (8%); e outros (tétano, hipotireoidismo, leptospirose, diabetes mellitus e aneurisma de aorta) (10%), e neutropenia foi observada em 8%. A maioria dos pacientes receberam antimicrobianos (vancomicina e/ou imipenem 87%) e um cateter venoso central (78%). O agente infeccioso mais frequente foi *C. albicans* (50%), seguido de *Candida parapsilosis* (17%). O tratamento foi realizado em 79% dos pacientes, sendo que 88%

destes receberam anfotericina B. Nos casos de infecção por *C. parapsilosis*, a remoção de catéter foi sugerida. A mortalidade global foi de 41%, sendo que as taxas mais altas foram observadas para os pacientes com *Candida tropicalis* (70%) e *C. albicans* (45%). Não se encontrou associação significativa entre o sexo, a idade, e o tratamento antifúngico, no entanto a neutropenia e a enfermidade hematológica apresentaram associação significativa com a morte dos pacientes. A persistência da fungemia também se associou com a mortalidade. Os autores concluíram que o principal agente etiológico da fungemia na população de estudada é *C. albicans*. A mortalidade se manteve alta apesar da terapia antifúngica, e provavelmente foi influenciada pela espécie (*C. tropicalis*), enfermidades hematológicas, neutropenia e persistência da fungemia.

No estudo realizado por Chandra et al⁴⁸. (2001) os autores consideram que a estomatite protética associada a *Candida* spp. é a forma mais comum de candidíase, tendo como agente etiológico *C. albicans*. A prótese dentária pode servir como um reservatório de *C. albicans*, mas muitos fatores podem contribuir para o desenvolvimento de estomatite protética. Assim, os autores descreveram o desenvolvimento e a otimização de um modelo de biofilme associado a *C. albicans*, e sua susceptibilidade aos antifúngicos. Para isso, foi desenvolvido um modelo reproduzível do biofilme de *C. albicans* em tiras de polimetilmetacrilato utilizado para determinar a susceptibilidade de *C. albicans* GDH 2346 (isolado de paciente com estomatite dentária) e OY-2-76 (isolado de paciente com AIDS com candidíase orofaríngea) contra três antifúngicos (anfotericina B, fluconazol e nistatina) e um antimicrobiano de amplo espectro (clorexidina). Os inóculos nas concentrações entre 10^{-5} e 10^{-7} resultaram em maior atividade metabólica e biomassa do biofilme, e os tempos de aderência a superfície entre 30 e 90 minutos aumentaram a atividade metabólica e o peso seco do biofilme. O tempo de incubação de até 72 horas aumentou o peso seco do biofilme da cepa GDH2346, enquanto que para a cepa OY-2-76 o maior valor de peso seco foi após 24 horas. A presença de glicose com yeast nitrogen base como meio de cultivo aumentou a formação de biofilme, e a presença de saliva aumentou o peso seco e a atividade metabólica do biofilme. Os resultados mostraram que as células de *C. albicans* associadas ao biofilme são resistentes aos antifúngicos em comparação com as células em forma planctônica. O crescimento de cultura planctônicas foi inibido nas concentrações antifúngicas mais baixas em comparação

com o biofilme. Foi observada uma redução metabólica (50% RAM) nas concentrações antifúngicas de 8; 16; 128 e >64 µg/mL para anfotericina B, nistatina, clorexidina e fluconazol, respectivamente no biofilme, e ao contrário os valores do (50% RAM) dos mesmos antifúngicos nas células planctônicas foram 0,25; 1,0; 4,0; e 0,5 µg/mL, respectivamente.

Kaplan⁴⁹ (2010) apresentou uma revisão de literatura sobre a dispersão de biofilme. Os biofilmes estão fortemente relacionados com muitas infecções crônicas. A primeira fase do desenvolvimento de biofilme é a adesão dos colonizadores primários a uma superfície. Iniciada a colonização, o biofilme apresenta multiplicação de bactérias na superfície e a sínteses da matriz polimérica extracelular, a qual mantém as células juntas e fixas firmemente. E por último, o desprendimento e dispersão ao meio ambiente, que se pode dividir em três fases distintas: (i) desprendimento das células do biofilme; (ii) translocação das células a uma nova localização, e (iii) fixação das células a uma nova localização. A dispersão é importante na transmissão de bactérias. Um dos mecanismos moleculares da dispersão de biofilme é a degradação enzimática da matriz que provoca o desprendimento das células e sua liberação ao meio ambiente. Na parte clínica, a enzima dispersina B de *A. actinomycetemcomitans* é um agente que poderia degradar a matriz do biofilme. Alguns estudos in vitro demonstraram que a dispersina B inibe a formação do biofilme. Concluiu-se que sobre a dispersão de biofilme poderia ajudar desenvolver novos agentes terapêuticos e profiláticos para o tratamento das infecções por biofilme.

Kucharíková et al⁵⁰. (2011) realizaram um estudo com o objetivo de analisar a formação do biofilme de *C. albicans* SC5314 e *C. glabrata* ATCC 2001 em presença de dois meios de cultivos diferentes (RPMI 1640 e YNB) utilizando dois valores de pH (pH 5,6 e 7,0). Analisou-se a adesão e a formação de biofilme, a expressão dos genes de adesina durante estes processos e a susceptibilidade às equinocandinas. As propriedades de adesão de *C. glabrata* foram independentes do meio e do pH, enquanto que *C. albicans* manifestou ter melhor adesão quando cultivada em meio RPMI 1640 e com um pH 7,0. O meio RPMI 1640 promoveu significativamente o desenvolvimento de biofilme maduros de *C. glabrata* e *C. albicans*. O meio RPMI 1640 com pH 7,0 influenciou positivamente na expressão de genes de adesina, que incluem ALS3 e EAP1 em *C. albicans* e EPA6 em *C. glabrata*. A espessura do biofilme para *C.*

albicans em meio RPMI 1640 e pH 5,6 e 7,0 foi de 60 μ m e 100 μ m, respectivamente, e para *C. glabrata* em meio RPMI 1640 e pH 5,6 e 7,0 foi de 20 μ m e 25 μ m, respectivamente. Isso poderia ter uma influência sobre a eficácia dos fármacos antifúngicos. Os cultivos de células planctônicas de *C. albicans* e *C. glabrata* foram susceptíveis a ambas equinocandinas. Não obstante, a caspofungina e a anidulafungina apresentaram efeitos potentes contra o biofilme maduro de *C. albicans*, enquanto que o biofilme de *C. glabrata* foi ligeiramente menos susceptível, ou seja, apresentou valores de CIM 50% e 90% maiores que *C. albicans*. Os biofilmes cultivados com YNB parecem ser mais susceptíveis às equinocandinas do que o biofilme cultivado com RPMI 1640 para ambas cepas. Em conclusão, o biofilme de *C. albicans* e *C. glabrata* mostraram uma arquitetura heterogênea, e o meio YNB utilizado foi menos rico em nutrientes para o crescimento de células planctônicas em comparação com o meio RPMI 1640 (meio com predominância de cloreto de sódio, glicose e aminoácidos). O meio e o pH não demonstraram nenhum efeito na adesão de *C. glabrata*, enquanto que para *C. albicans* a adesão foi significativamente maior em RPMI 1640 do que em meio YNB.

3.2 Sistema de Efluxo – Inibidores de Sistema de Efluxo

White et al¹³. em uma revisão de literatura em 1998 relataram os fatores clínicos, moleculares e celulares que poderiam estar associados ao desenvolvimento de resistência fúngica. A resistência aos medicamentos antifúngicos é um problema muito importante especialmente para as pessoas com o vírus do HIV, e 33% dos pacientes com AIDS em último estágio têm cepas de *C. albicans* resistentes aos medicamentos. Assim, resistência aos antifúngicos é um amplo conceito que descreve a falha de uma terapia antifúngica que resulta na persistência ou progressão da infecção. Dois tipos de resistência foram definidos: a primária ou intrínseca (um organismo que é resistente aos medicamentos antes da exposição), e a secundária (desenvolvida em resposta após a exposição a algum agente antimicrobiano). Em termos laboratoriais, a resistência antifúngica é determinada pela Concentração Inibitória Mínima (CIM), em que o crescimento do micro-organismo é mensurado com uma série de concentrações do agente antimicrobiano ao longo de um período de tempo. Os autores também descreveram que a resistência aos azóis é consequência de mutações genéticas que promovem alterações no alvo da droga, superexpressão de transportadores

multidrogas da membrana plasmática (bombas de efluxo) e sinalização de vias de respostas ao estresse celular. As células eucariotas apresentam duas principais classes de sistemas de efluxo microbiano da membrana plasmática que são clinicamente importantes, porque contribuem com a resistência aos medicamentos antifúngicos: as classes de transportadores ABC, e a classe de transportadores MFS.

C. albicans é o fungo mais comum nas infecções relacionadas com o biofilme. Sua formação consta de três fases: a fase de aderência (0 a 11 horas), fase intermediária (12 a 30 horas) e a última etapa é a fase de maturação (31 a 72 horas). Mukherjee et al⁵¹. (2003) realizaram um estudo para investigar os mecanismos da resistência ao fluconazol em biofilme de *C. albicans*. Foram usadas cepas isogênicas de *Candida*, que carecem de um, dois ou três genes de resistência (CDR1, CDR2 ou MDR1) e as cepas parentais usadas foram SC5314, CAF2-1, CAF2-1, CAF2-1, CAF2-1. Os biofilmes foram cultivados no meio de cultura Yeast Nitrogen Base e em três fases, inicial (6 horas), intermediária (12 horas) e madura/tardia (48 horas). Neste estudo, demonstrou-se que os biofilmes formados por cepas mutantes foram parecidos em estrutura e morfologia aos biofilmes formados por cepas parentais. Porém, na fase inicial de 6 horas, os biofilmes formados pelas cepas mutantes com ausência de 2 ou 3 genes foram mais susceptíveis ao fluconazol (CIM = 64 e 16 µg/mL, respectivamente) em comparação com a cepa parenteral (CIM > 256 µg/mL). As análises de RNA em *Northern Blot* indicaram que os biofilmes de *C. albicans* expressaram genes CDR e MDR1 em todas as fases, mas as células planctônicas expressaram esses genes somente nos tempos de 12 e 48 horas. O MDR1 foi detectado na fase inicial do biofilme, mas não em células planctônicas no mesmo tempo. Porém, os níveis de transcrição de MDR1 para células planctônicas e biofilme foram mais altos às 12 horas e mínimas às 48 horas. Os transcritos de MDR1 às 6 horas não diferiram daqueles às 48 horas. A funcionalidade das bombas de efluxo foi comprovada por ensaio com rodamina 123 (atua como substrato das bombas de efluxo), que demonstrou que os níveis de retenção de rodamina em biofilme às 6 horas foi menor em comparação com as células planctônicas na fase inicial, mas não nas fases posteriores (12 e 48 horas). Isso indicaria uma maior atividade das bombas de efluxo na fase inicial do biofilme. As análises dos esteróis de membrana em cromatografia líquida-gasosa demonstraram que o ergosterol diminuiu em 41% entre às 6 e 12 horas em biofilme. Na fase madura, reduziu em 50% em comparação com o biofilme na fase inicial. Essa redução do

ergosterol poderia estar relacionada com a resistência do biofilme nas fases intermediária e madura. Os autores concluíram que a resistência antifúngica em *C. albicans* é multifatorial relacionada à fase de desenvolvimento do biofilme, com as bombas de efluxo atuando na fase inicial e alterações de esterol atuando nas fases intermediária e tardia.

O mecanismo de resistência mais frequente parece ser a bomba de fluxo ativa, e algumas cepas expressam alterações genéticas. A citometria de fluxo apresenta resultados de suscetibilidade de *Candida* spp. ao fluconazol usando coloração fluorescente (FUN-1). Pina et al³³. (2005) realizaram um estudo para mostrar os mecanismos de reversão de resistência aos antifúngicos relacionando-se às bombas de efluxo com diversos moduladores que podem bloquear a resistência. Foram usadas 42 cepas de *Candida* spp. (38 resistentes ao fluconazol), duas cepas padrões (ATCC) e duas cepas de *C. albicans* com mecanismos conhecidos de resistência ao fluconazol. Os fenótipos das cepas foram classificados de acordo com seguintes valores de CIMs: para fluconazol, 8 mg/L susceptível (S); 64 mg/L resistente (R); para itraconazol 0,125 mg/L (S); 1 mg/L (R); para voriconazol 1 mg/L (S), 4 mg/L (R). Para os moduladores das bombas de efluxo, as concentrações não letais (sub-CIM) selecionadas foram: verapamil 100 µM, b-estradiol 50 µM, progesterona 50 µM e ibuprofeno 100 mg/L. As CIM de fluconazol, itraconazol e voriconazol foram também determinadas na presença dos moduladores. Levedura expostas ou não aos moduladores na concentração que apresentou sinergismo com fluconazol foram coradas com FUN-1 e analisadas por citometria de fluxo. Itraconazol marcado com ³H também foi usado para estudar o fluxo de saída do fármaco na presença e ausência de moduladores. Os resultados mostraram que a susceptibilidade para fluconazol e itraconazol foi idêntica, a maioria das cepas de *C. albicans* resistente ao fluconazol também mostrou resistência ao voriconazol, e a maioria das cepas de *C. tropicalis*, *C. glabrata* e todas as cepas de *C. krusei* foram suscetíveis ao voriconazol. Os moduladores revertem a resistência de todas as cepas com resistência cruzada aos azóis. A reversão da resistência ao fluconazol não ocorreu em *C. krusei*, em 2 isolados de *C. albicans* e em 3 isolados de *C. glabrata*. Os moduladores não afetaram a viabilidade celular. Nas cepas com reversão da resistência, a coloração por FUN-1 resultou em aumento na intensidade de fluorescência e na formação de estruturas intravacuolares (indicativo de integridade de membrana e capacidade metabólica). As cepas suscetíveis a azóis acumularam [³H]

itraconazol depois da incubação com moduladores, e as cepas resistentes com fenótipo revertido acumularam mais fármaco radioativo. Concluiu-se que a resistência relacionada com a superexpressão da atividade da bomba de efluxo foi revertida pelos moduladores. Além disso, os moduladores testados não puderam reverter a resistência de *C. krusei*, como também foi o caso de algumas cepas de *C. albicans*. O verapamil é um inibidor conhecido da glicoproteína P humana que demonstrou ser extremamente eficaz para reverter a resistência ao fluconazol. Não obstante, a concentração requerida para produzir este efeito in vivo poderia causar efeitos secundários. O ibuprofeno é um composto promissor em associação com os azóis, que merece ensaios clínicos futuros. FUN-1 demonstrou ser um bom marcador de efluxo em *Candida*.

Prasad et al¹⁸. (2006) numa revisão de literatura relataram que os principais mecanismos de resistência antifúngica incluem alterações na via biossintética do ergosterol por uma superexpressão do gene ERG11 que codifica a enzima 14 α -demetilase. Acúmulo intracelular reduzido de drogas é outro mecanismo de resistência em células de *Candida*. Mais comumente, os genes que codificam as bombas de efluxo de drogas pertencentes às superfamílias ABC (Cdr1p, Cdr2p) e MFS (Mdr1p) de proteínas são superexpressos em isolados de *Candida* resistentes aos azóis. A gama de substratos de Cdr1p inclui compostos tais como azóis, lipídios e esteroides, que é uma característica da maioria dos transportadores de drogas do tipo ABC. As proteínas MFS, têm um papel no fenômeno de resistência a múltiplos fármacos apresentado por leveduras. MDR1 foi inicialmente identificado como um gene, a expressão de MDR1 em *Saccharomyces cerevisiae* confere resistência a vários fármacos e sua superexpressão tem sido associada à resistência a azóis em *C. albicans*. A expressão de MDR1 em células de *C. albicans* é aumentada por benomil, metotrexato e várias outras drogas, e é mais pronunciada em alguns isolados clínicos resistentes a azóis. a FLU1 não está envolvida no desenvolvimento da resistência ao fluconazol em isolados clínicos de *C. albicans*. A expressão de CDR1 em isolados clínicos resistentes a azóis de *C. albicans* incluem mutações na região promotora do gene, regulação alterada por fatores trans-reguladores controlando a expressão ou mudanças moleculares durante o processamento do mRNA. Portanto, atenção considerável aos aspectos estruturais e funcionais dessas proteínas pode levar a melhores estratégias para projetar moduladores / inibidores dessas bombas para o desenvolvimento de drogas que possam bloquear a expressão desses genes.

Cannon et al¹⁵. (2007) realizaram uma revisão de literaturas sobre a resistência de *C. albicans*. A resistência aos antimicrobianos aumentou nas últimas décadas com o maior uso desses agentes. A exposição de *C. albicans* aos fármacos antifúngicos promove respostas de estresse fenotípico que dependem da dose do medicamento. A tolerância ao fármaco é a resposta imediata de *C. albicans* aos antifúngicos, permitindo assim a evolução da resposta de estresse que confere níveis mais altos da resistência. Os antifúngicos que são eficazes contra *C. albicans* afetam a composição e integridade da parede celular e da membrana, induzindo respostas de estresse. O estresse oxidativo induz respostas principalmente através do fator de transcrição Cap1p que está associado à resistência a maioria dos fármacos. A maioria dos mecanismos da resistência antifúngica estabelecidos deve-se a mutação genética. A mutação do gene ERG3 causa resistência à anfotericina B e também confere resistência aos azóis. A resistência de *C. albicans* a polienos é rara, mas pode ser causada por uma redução na quantidade de ergosterol da membrana plasmática. Os azóis são usualmente fungistáticos, mas se for inibida a atividade da calcineurina de *C. albicans*, os azóis tornam-se fungicidas. A terapia combinada pode ser usada com uma baixa probabilidade de que surja resistência a ambos os fármacos, pois ela seleciona cepas que não desenvolvem resistência, porém os resultados clínicos são variáveis com necessidade de se aumentar os testes de eficácia. Outra estratégia é abolir a resposta de estresse inicial, como a calcineurina, proteína 90 de choque térmico (Hsp90), formação de biofilme e reguladores da transcrição das bombas de efluxo. Uma terceira estratégia é a seleção cuidadosa de fármacos, como as que agem em produtos de genes essenciais e em alvos extracelulares. Em conclusão, para garantir que os novos antifúngicos não funcionem como fatores de estresse que desencadeie em tolerância e resistência, é importante elucidar a biologia, a fisiologia e as respostas de estresse de *C. albicans*.

No trabalho de Sharma et al³⁵. (2009), curcumina a 100 μ M inibiu o efluxo de rodamina 6G em células de *Saccharomyces cerevisiae* com superexpressão do transportador ABC Cdr1p de *C. albicans* na presença de glicose, isto também foi observado em células de *C. albicans*, e essa inibição foi substrato-específica, tendo em vista a ausência de efeito da curcumina no efluxo de fluconazol. Não foi observado inibição do efluxo de [³H] metotrexato quando as células de *S. cerevisiae* com superexpressão do transportador MFS Mdr1p de *C. albicans* foram tratadas com

concentrações quatro vezes maiores de curcumina. A curcumina foi novamente efetiva em inibir o efluxo de rodamina 6G quando outros transportadores ABC foram superexpressos (Cdr2p de *C. albicans* e Pdr5p de *S. cerevisiae*), demonstrando assim a seletividade da curcumina pelos transportadores ABC. Também foi verificado que a curcumina inibiu a marcação de fotoafinidade do receptor Cdr1p, não apresentou efeito na atividade ATPase e na expressão de Cdr1p, indicando que a curcumina não é transportada, mas sim age como inibidor competitivo direto do transportador Cdr1p. A curcumina foi seletivamente sinérgica com R6G, cetoconazol, itraconazol e miconazol (índice de concentração inibitória fracional: FICI < 0,5). Porém, não apresentou sinergismo com fluconazol, voriconazol, cicloheximidina, anisomicina e FK520. Células com alterações mutantes do transportador Cdr1p com efluxo anulado de rodamina 6G também apresentaram redução do efluxo na presença de curcumina, sugerindo que a curcumina apresenta locais independentes de ligação no transportador Cdr1p. A curcumina modula apenas transportadores de múltiplas drogas ABC e pode ser explorada em combinação com certas drogas antifúngicas convencionais para reverter a resistência a múltiplos fármacos em células de *Candida* spp.

Garcia et al⁵². (2012) realizaram um estudo para avaliar a capacidade da curcumina em sensibilizar cepas de *C. albicans*, uma delas (isolado clínico bucal de paciente HIV) com alta resistência ao fluconazol (PRI). Neste trabalho, foi também avaliada a atividade sinérgica da curcumina com o fluconazol. Para avaliar as bombas de efluxo, foram realizados testes de acúmulo intracelular de vermelho Nilo e rodamina 6G. CIM₈₀ do fluconazol para cepa resistente foi de 64 mg/L, e para susceptível, 8 mg/L; já do itraconazol para resistente foi de 1,0 mg/L e para susceptível, 0,125 mg/L. Os resultados demonstraram que o PRI isolado (CIM 265 mg/L) foi resistente ao fluconazol em comparação com as cepas controle ATCC 24433 (CIM 2 mg/L) e o isolado clínico 88 (2 mg/L). Demonstrou-se que a curcumina na concentração de 50 µM promoveu a maior inibição do crescimento do isolado 88, mas também demonstrou inibição para as outras cepas avaliadas. A rodamina 6G foi retida pela cepa PRI, a qual não apresentou acúmulo do vermelho Nilo, enquanto que a cepa ATCC24433 apresentou retenção para ambos corantes. A curcumina na concentração de 11 µM foi capaz de restaurar a retenção do vermelho Nilo para a cepa PRI. A curcumina a 11 µM restaurou a sensibilidade ao fluconazol da cepa PRI, pois quando associada ao fluconazol 4 mg/L inibiu 80% do crescimento dessa cepa. Concluiu-se que a curcumina atuou

sinergicamente com o fluconazol, mostrando resultados favoráveis para a inibição das bombas de efluxo, possivelmente da classe MFS.

A eficácia do fluconazol e outros agentes antifúngicos pode ser melhorado através de terapia combinada. O timol (THY) e o carvacrol (CARV) poderiam ter um possível efeito antifúngico sinérgico com os azóis. Ahmdad et al³⁹. (2013) realizaram um estudo para avaliar a atividade antifúngica in vitro dos monoterpenos, THY e CARV, em combinação com o fluconazol (FLC) contra cepas de *Candida* spp. (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*) susceptíveis e resistentes (cepas padrões e isolados clínicos). As cepas foram cultivadas no meio de cultura YPD e foram avaliadas a combinação de um dos monoterpenos com o fluconazol contra 38 cepas de *Candida* spp. susceptíveis (CaS) e 11 resistentes (CaR) ao fluconazol. As CIM de THY e CARV variaram entre 90 - 150 µg/mL e 50 - 100 µg/mL, respectivamente, e do fluconazol, entre 2,5-7,5 µg/mL para CaS e entre 85 - 110 µg/mL para CaR. Para CaS, 32 e 34 cepas mostraram sinergismo nas combinações de THY - FLC e CARV - FLC, respectivamente, e para CaR, 8 e 10 cepas mostraram sinergismo nas combinações de THY - FLC e CARV - FLC, respectivamente. A combinação de THY - FLC depois de 12 horas de incubação mostrou uma diminuição de 2,1 log₁₀(UFC/mL) em comparação com apenas o fluconazol. CARV - FLC diminuiu 2,6 log₁₀(UFC/mL). A atividade de efluxo do fármaco na presença e ausência dos compostos foi determinada usando dois corantes, rodamina 6G (R6G) e Hoechst 33342. Três isolados resistentes de *Candida* spp. aumentaram o acúmulo de Hoechst em 1,25 a 2,25 vezes. Cepas resistentes e susceptíveis não mostraram diferenças significativas na captação de R6G quando foram incubadas em solução salina tamponada de fosfato (PBS) livre de glicose, porém quando adicionou-se 0, 1 M glicose observou-se maior fluxo para as cepas resistente ao FLC em comparação com as cepas susceptível ao FLC. Os dois monoterpenos mostraram uma inibição de efluxo de R6G de 70 a 85%. Os dois monoterpenos reduziram a expressão dos genes de resistência ao fluconazol CDR1 e MDR1, sendo que *C. albicans* expressou somente o gene MDR1 e *C. glabrata* e *C. krusei* expressaram ambos as gentes. Concluiu-se que o THY e CARV aumentaram a sensibilidade fúngica ao FLC diminuindo seu efluxo pelas bombas CDR1 e MDR1.

O fluconazol é um dos fármacos antifúngicos mais importantes na clínica, e a tunicamicina é um antibiótico nucleosídico. Yu et al³⁶. (2013) realizaram um estudo para

avaliar a atividade in vitro do verapamil em combinação com o fluconazol ou tunicamicina em biofilme em formação e biofilme pré-formado de *C. albicans*. Os resultados demonstraram que as concentrações do verapamil > 20 mg/L inibiram o metabolismo tanto do biofilme em formação como do biofilme pré-formado, além de apresentar sinergismo com o fluconazol e tunicamicina. Quando o verapamil foi utilizado com o fluconazol, a CIM₅₀ reduziu de 320 para 80 mg/L e de >256 para 0,5 mg/L, respectivamente, a associação de verapamil com a tunicamicina reduziu a CIM₅₀ de 320 para 40 mg/L e de 8 para 2 mg/L, respectivamente. Também, foi verificado que o tratamento com verapamil ou tunicamicina e a associação de verapamil com o fluconazol ou tunicamicina reduziram significativamente a expressão do gene ALS3. Concluiu-se assim que o verapamil pode ser um agente favorável para potencializar o efeito dos fármacos antifúngicos contra o biofilme de *C. albicans*.

C. albicans é um patógeno fúngico oportunista que desenvolve uma rede de sinalização elaborada para reconhecer e responder ao estresse oxidativo. A via de sinalização de cálcio, também denominada via de sobrevivência celular de cálcio (SCC), desempenha um papel essencial na resposta ao estresse. Yu et al⁵³. (2014) realizaram um estudo para avaliar o efeito do verapamil sobre a resposta ao estresse oxidativo neste fungo. Os resultados demonstraram que o verapamil aumentou a sensibilidade de *C. albicans* ao estresse oxidativo causado por H₂O₂ na dependência de cálcio extracelular, reduziu a quantidade de cálcio intracelular e a expressão de genes de resposta dependentes de cálcio (CCH1 e CRZ1) e de estresse oxidativo (CAP1 e IPF7817) durante essa condição. O verapamil causou maior estresse oxidativo, e as células tratadas com o verapamil e H₂O₂ acumularam mais ROS intracelulares do que as tratadas somente com H₂O₂. As células tratadas com H₂O₂ apresentaram maior atividade de SOD e GSH, porém o verapamil resultou em uma diminuição da atividade de SOD e GSH. Concluiu-se que o verapamil teve um efeito inibitório sobre a resposta ao estresse oxidativo, o que confirma a relação entre a sinalização do cálcio e o estresse oxidativo em *C. albicans*.

A morfogêneses e a colonização gastrointestinal de *C. albicans* estão relacionadas com a patogenicidade deste patógeno. Um determinante morfogenético conhecido é o Hwp1 que é importante no desenvolvimento de hifa, na formação de biofilme, adesão e multiplicação fúngica. Yu et al⁵⁴. (2014) realizaram um estudo para

investigar o efeito in vitro e in vivo do verapamil na formação de biofilme e de hifas, na adesão e colonização gastrointestinal. As cepas utilizadas neste estudo foram SC5314 e NKF152. Para formação de hifas e aderência às células epiteliais bucais (BEC), utilizou-se o verapamil nas concentrações de 0; 10; 20; 40; 80; 160; 320 e 640 µg/mL, e para a medição da colonização gastrointestinal usou-se o verapamil na concentração de 10 mg/kg dia. O aumento da concentração do verapamil ≥ 10 µg/mL resultou em uma diminuição significativa das hifas de *C. albicans*. O verapamil demonstrou ter um efeito inibidor na aderência de *C. albicans* ao poliestireno e BEC em concentrações ≥ 20 µg/mL. O verapamil inibiu a expressão do gene HWP1, o que pode contribuir no seu efeito inibidor sobre a morfogênese. Os resultados in vivo do verapamil demonstraram uma inibição na colonização gastrointestinal de *C. albicans*, por exposição de 10 mg/Kg/dia que pode estar associado com o efeito sobre o desenvolvimento de hifas e a adesão de este patógeno. Em conclusão, neste estudo foi demonstrado que o verapamil apresenta um efeito inibidor sobre o desenvolvimento de hifas, na adesão e na colonização gastrointestinal.

O fluconazol é mais comumente usado para tratar infecções por *C. albicans*, mas a resistência devido à superexpressão de bombas de efluxo de múltiplas drogas é de grande preocupação. Reis et al⁵⁵. (2016) avaliaram a capacidade de cinco compostos sintéticos de organotelúrio e o fluconazol contra cepas de *S. cerevisiae* e *C. albicans* com superexpressão de Cdr1p, Cdr2p, Mdr1p e também Erg11p (lanosterase 14 α -demetilase, enzima responsável pela biossíntese de ergosterol inibida pelo fluconazol), cinco compostos de organotelúrio (1 a 5) foram efetivos em restaurar a susceptibilidade ao fluconazol de cepas de *S. cerevisiae* com superexpressão de Mdr1p. Quatro compostos (1 a 4) restauraram a susceptibilidade de cepas Cdr1p e inibiram sua atividade ATPase, porém os cinco compostos apresentaram pouco efeito em cepas Cdr2p. Foi verificado sinergismo entre os compostos efetivos e o fluconazol. Esses cinco compostos (1 a 5) também promoveram acúmulo intracelular de vermelho Nilo (substrato de Cdr1p e Mdr1p) e quatro deles (1 a 4), de rodamina 6G (substrato de Cdr1p), impedindo o efluxo dessas substâncias que foi confirmado por citometria de fluxo. Quando isolados clínicos de *C. albicans* foram avaliados, os compostos 1 a 4 restauraram a susceptibilidade ao fluconazol da cepa com superexpressão Cdr1p e Cdr2p, os compostos 1 a 5 sensibilizaram o isolado com superexpressão Mdr1p e Erg11p e somente os compostos 1 e 2 foram efetivos no isolado com superexpressão

dos quatro genes (CDR1, CDR2, MDR1 e ERG11). Quando a expressão desses quatro genes foi avaliada na presença dos compostos 1 e 2, estes não reduziram a expressão gênica, sugerindo que a inibição do efluxo causada por esses compostos ocorra por meio de uma interação direta desses com os sistemas de efluxo.

Em *C. albicans*, a diminuição da saída de cálcio pelo verapamil produz uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo, produzindo assim espécies reativas tóxicas e inibindo o metabolismo do fungo. A via de sinalização de cálcio em *C. albicans* é importante para a transformação em hifas, e o bloqueio da saída de cálcio produzido pelo verapamil inibe esse desenvolvimento. Tem sido reportado na literatura que o verapamil in vitro atua contra a formação do biofilme de *C. albicans*, e apresenta sinergismo com os antifúngicos. Nazik et al⁵⁶. (2017) realizaram um estudo para avaliar o efeito do verapamil, em combinação ou não com o voriconazol, na formação de biofilme e em biofilme pré-formado de *Aspergillus fumigatus*. Foi determinada a CIM e CFM (Concentração Fungicida Mínima) do verapamil e voriconazol. Os efeitos foram avaliados por atividade metabólica (XTT) após exposição ao verapamil, voriconazol e verapamil com voriconazol. A menor concentração de verapamil para biofilme pré-formado com resultados inibitórios foi de 7,8 µg/mL e para formação de biofilme foi de 39 µg/mL. Para o voriconazol, as concentrações de 0,125-2 µg/mL resultou em inibição consistente para biofilme pré-formado e formação de biofilme. Na formação do biofilme observou-se menor inibição das combinações (antagonismo) em comparação com o controle (fármaco isolado). E para o biofilme pré-formado não houve resultados significativos entre o voriconazol e o verapamil com o voriconazol. O verapamil em culturas planctônicas de *A. fumigatus* não mostrou nenhum efeito (indiferença). Em conclusão, neste estudo não se mostrou sinergismo do verapamil com o voriconazol em biofilme de *A. fumigatus*, tanto para o biofilme pré-formado como na formação do biofilme.

O transportador ABC de *C. albicans* (Cdr1p) é um dos responsáveis na resistência aos agentes antifúngicos, considerado como um transportador ativo primário multicomponente capaz de transportar tanto moléculas pequenas como macromoléculas. A necessidade de moduladores/inibidores desta proteína mostra sua capacidade para reverter a resistência aos fármacos mediados por Cdr1p. Tran-Nguyen et al⁵⁷. (2017) realizaram uma revisão para descrever os possíveis mecanismos de uma

molécula que pode atuar como inibidor/modulador da proteína CaCdr1p. Os autores relatam que uma bomba de efluxo apresenta dois domínios transmembrana (TMD1 e TMD2), e dois domínios de união a nucleotídeos situados no citoplasma, uns dos quais tem um terminal amino (N-NBD) e outro um terminal carbóxilo (C-NBD). Cada TMD contém seis segmentos transmembrana (TMS). Existem 6 mecanismos possíveis para uma molécula modular CaCdr1p: 1) Uma molécula pode se ligar direta ou indiretamente com o local de ligação de ATP da estrutura do CaCdr1p de uma maneira competitiva. 2) Uma molécula pode bloquear a hidrólises de ATP, evitando o restabelecimento da estrutura da proteína para a união do fármaco. 3) Uma molécula pode atuar como inibidor/modulador de CaCdr1p ao interagir direta o indiretamente com a união ao substrato nos TMD de CaCdr1p. 4) Uma molécula pode interagir com um segmento transmembrana, interrompendo a estrutura de CaCdr1p, resultando em má função da extrusão de substâncias. 5) A inibição da expressão do gene CDR1, pois a resistência aos fármacos azóis em *C. albicans* está relacionado com a superexpressão das bombas de fluxo, incluindo CaCdr1p, que possivelmente está mediada por uma mutação de genes. 6) Por último, outro possível mecanismo de modulação é a alteração da composição lipídica (principalmente esfingolipídeos e esteróis), que afeta o posicionamento e o funcionamento de CaCdr1p na membrana citoplasmática. Na clínica, moléculas como macrolídeos, diterpenóides macrocíclicos, peptídeos não-ribossomais cíclicos, depsipeptídeos cíclicos, D-octapeptídeos, derivados do fenol, componentes diversos e componentes inorgânicos podem ser administradas como moduladores de CaCdr1p na terapia antifúngica, algumas dessas moléculas mostram sinergismo com os agentes antifúngicos, outros também podem inibir Cdr2p e/ou Mdr1p. Concluiu-se que essas informações poderiam ser usadas em estudos futuros para reverter a resistência antifúngica e melhorar o uso terapêutico dos antifúngicos.

3.3 Curcumina e Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT)

Martins et al³¹. (2009) avaliaram a atividade antifúngica da curcumina em 23 cepas de fungos e o efeito inibidor in vitro sobre a adesão de espécies de *Candida* a células epitelial bucais humanas (BEC). Os autores avaliaram a susceptibilidade antifúngica mediante um ensaio de microdiluição para leveduras e fungos filamentosos. A concentração usada da curcumina foi de 0,5-256 mg/L e do fluconazol 0,06 - 64 mg/L, sendo a CIM da curcumina para *C. albicans* de 64 mg/L e do fluconazol de 2 mg/L. Os

isolados de *Paracoccidioides brasiliensis* foram os mais susceptíveis a curcumina, e a curcumina foi mais potente do que o fluconazol na inibição do crescimento dessa levedura oportunista. A curcumina (32 mg/L) foi capaz de inibir o crescimento de *C. neoformans* e os isolados clínicos de *Candida dubliniensis* Cd22 e Cd28, sendo a espécie *C. albicans* a mais susceptível à curcumina (64 mg/L) dentre as espécies de *Candida* estudadas. A curcumina (32mg/L) foi capaz de inibir a adesão a BEC de todas as espécies de *Candida* estudadas e foi muito mais eficiente que o fluconazol na inibição da adesão de espécies de *Candida* à BEC, particularmente aquelas isoladas da mucosa bucal de pacientes com AIDS. Os autores relatam que a adesão de micro-organismos à superfícies da mucosa é um requisito prévio para a colonização e a infecção. Além disso, indicaram que a curcumina é um composto promissor para novos agentes antifúngicos, pois a curcumina inibiu *Candida tropicalis* à BEC em 55%, enquanto que o fluconazol inibiu somente em 13%. Concluiu-se assim a importância para desenvolver antifúngicos novos, elaborados de produtos naturais tendo um amplo espectro na atividade antifúngica. Foi demonstrado neste estudo que a curcumina inibiu a adesão de espécies de *Candida* de pacientes com AIDS a BEC, o que poderia ajudar para futuras investigações sobre o seu uso terapêutico em pacientes imunocomprometidos.

Dovigo et al²⁹. (2011) avaliaram a associação da curcumina com diodo emissor de luz (LED) para a inativação de em culturas planctônicas e biofilmes de *C. albicans*. Um intervalo de nove diferentes concentrações de curcumina foram preparadas em 10% de dimetilsulfoxido (DMSO) em associação com diferentes fluências de luz LED. Foi observado que a capacidade da curcumina para absorver a luz diminuiu progressivamente à medida que o tempo de iluminação foi aumentado. Após uma dose de luz de 0,4 J/cm², aproximadamente 70% da curcumina havia sido fotodegradada, mostrando uma alta taxa de degradação. Foi observado que a curcumina na concentração de 20 µM a uma potência de luz de 37,5 J/cm², para culturas planctônicas resultou em completa inativação do micro-organismo. Todos os tempos de pré-irradiação (TPI) foram capazes de reduzir a viabilidade de *C. albicans* após a aPDT. Em biofilmes de *C. albicans*, curcumina a 40 µM apresentou uma diminuição de 87,22% no metabolismo de *C. albicans* utilizando uma potência de 5,28 J/cm² com um TPI de 20 minutos. O efeito da aPDT pelo ensaio MTT em culturas de macrófagos resultou em redução significativa no metabolismo celular de 7,13%, 17,22%, 82,51%, 73,26% e

86,39% para concentrações de curcumina (0,5; 1,5; 10 e 20 μM). Concluiu-se que a aPDT mediada pela curcumina demonstrou ser efetivo para a inativação de *C. albicans*, as fluências de irradiação superiores a 5,28 J cm^2 não influenciaram na eficácia fototóxica da curcumina contra *C. albicans*, a aPDT (20 μM e 5,28 J/cm^2) não causou a inibição completa dos macrófagos, enquanto que foi capaz de inativar completamente *C. albicans* planctônica. Isto sugere que *C. albicans* pode ser mais suscetível à aPDT do que os macrófagos.

Dovigo et al³⁰. (2011) avaliaram a aPDT mediada pela CUR em concentrações de 5, 10 e 20 μM como fotossensibilizador em culturas planctônicas de isolados clínicos de *C. albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*, com tempo de pré iluminação de 20 min e uma dose de luz correspondente a 5,28; 18, 25,5 e 37,5 J/cm^2 . E para biofilme esses autores testaram concentrações de 20, 30 e 40 μM nas mesmas espécies de *Candida* com tempo de pré iluminação de 20 min e uma dose de luz correspondente a 5,28; 18 J/cm^2 . Os resultados demonstraram uma redução de 4 *C. albicans* utilizando 20 μM de CUR associada às diferentes doses de luz, *C. tropicalis* utilizando 10 μM de CUR em todas as doses de luz e *C. glabrata* precisou de 20 μM de CUR associado a uma dose de luz 18 J/cm^2 . Também foi observada uma diminuição da atividade metabólica (XTT) cerca de 80% em biofilmes de *C. albicans* e *C. glabrata* com 40 μM de CUR associada a 5,28 e 18 J/cm^2 . Para biofilme de *C. tropicalis* foi observada uma diminuição do metabolismo de 73% em relação ao controle, utilizando 40 μM e uma dose de luz de 18 J/cm^2 a tingção com cristal violeta demonstrou para *C. albicans* ser uma forte cepa formadora de biofilme em comparação com as cepas de *C. glabrata* e *C. tropicalis*.

Num estudo de caso clínico realizado por Mima et al⁵⁸. (2011) os autores descrevem cinco casos de estomatite protética (DS) tratadas com terapia fotodinâmica (aPDT). Realizou-se cultivos de próteses e palato de todos os pacientes que foram positivos para as espécies de *Candida* antes do tratamento. Os pacientes foram submetidos a seis sessões de aPDT (3 vezes por semana) durante 15 dias. Em cada sessão, nas próteses totais superiores e nos palatos foi aplicada uma hematoporfina como agente fotossensibilizador (FS) (Photogem®) por 30 minutos (TPI) e depois foram irradiados por 26 min e 30 min (37,5 e 122 J/cm^2), respectivamente. Os resultados demonstraram que todos os pacientes mostraram DS tipo II ao início do estudo (dia 0) e

quatro pacientes apresentaram uma melhoria da inflamação do palato depois das sessões da aPDT (dia 15) e só um paciente demonstrou uma redução na inflamação do palato. A recorrência de DS foi observada em 3 pacientes durante o período de acompanhamento (30 e 60 dias). Concluiu-se que a aPDT poderia ser um tratamento promissor para a DS, sendo o mecanismo da inativação dos fungos diferentes ao dos agentes antifúngicos. Entretanto, somente foram avaliados pacientes com DS tipo II. Sendo assim, futuras e novas pesquisas dirigidas a aplicações clínicas da aPDT precisam ser desenvolvidas.

Segundo Soukos e Goodson⁵⁹ (2011), aPDT baseia-se em um agente químico (fotossensibilizador) que absorve luz possa ser capturado preferencialmente por bactérias e ativado pela luz do comprimento de onda apropriado na presença de oxigênio para gerar oxigênio singleto e radicais livres que são tóxicos para os microrganismos. Dessa forma, podem ocorrer duas reações distintas ocasionados desse processo: reação tipo I, implica transferência de elétron no estado tripleto do fotossensibilizador excitado, com a participação do substrato para produzir íons-radicais que podem reagir com o oxigênio resultando espécies citotóxicas como: hidroxilas e radicais derivados de lipídios. Na reação tipo II, implica transferência de energia de moléculas do fotossensibilizador excitadas ao seu triplo estado diretamente às moléculas de oxigênio. Para produzir oxigênio singleto em estado excitado que é altamente reativo e considerado a espécie de oxigênio de maior citotoxicidade obtida na aPDT. Na aPDT um agente fotossensibilizador deve possuir as seguintes propriedades: um alto rendimento quântico do estado tripleto para obter grandes concentrações do fármaco ativado; um alto rendimento quântico de oxigênio singleto; alta afinidade de ligação por microorganismos; um amplo espectro de ação; baixa propensão para seleção de cepas bacterianas resistentes; um risco mínimo de promover processos mutagênicos; e baixa toxicidade química. Estratégias terapêuticas para infecções relacionadas a biofilme incluem o uso de substâncias para atingir a matriz de biofilme, bactérias não crescentes (células persistentes) dentro de biofilmes e/ou quorum sensing. O uso de bacteriófagos e peptídeos antimicrobianos de ocorrência natural ou sintéticos pode oferecer a possibilidade de direcionamento bacteriano sem o surgimento de resistência. aPDT tem sido proposta na odontologia como tratamento alternativo ao uso de antimicrobianos tópicos e sistêmicos tradicionalmente usados no

controle de infecções orais como: cárie dental, doenças periodontais e peri-implantes, infecção endodôntica e candidose oral.

Prates et al³⁴. (2011) investigaram se os principais sistemas de efluxo de múltiplos fármacos afetavam a eficiência da inativação fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) mediada por azul de metileno (MB) em fungos patogênicos e testaram inibidores específicos desses sistemas de efluxo para potencializar aPDT. Foram usadas cepas de *C. albicans* parental e mutantes com superexpressão das bombas ABC e MFS. A captação e a localização citoplasmática do FS foram obtidas por microscopia confocal a laser. As suspensões de levedura foram iluminadas com laser de diodo GaAlAs com um comprimento de onda de 660 nm e uma potência total de 50 mW. As cepas de levedura foram continuamente irradiadas com fluências variando de 0 a 60 J/cm². Foi verificado que a superexpressão dos sistemas de efluxo, principalmente da classe ABC, de *C. albicans* anulou o efeito fungicida da aPDT mediada pelo azul de metileno, uma vez que a superexpressão desses sistemas reduziram a captura do FS pela célula. Foi observado por microscopia a laser confocal que a superexpressão da classe ABC de *C. albicans* reduzia significativamente em até 90% a captura do FS, enquanto que a superexpressão da classe MFS reduzia significativamente a captura do azul de metileno em 40%. As bombas de efluxo da família ABC estão diretamente implicadas no efluxo de MB do citoplasma da célula. Um inibidor de ABC pode ser utilmente combinado com o MB na aPDT para o tratamento da infecção por *C. albicans*.

Andrade⁶⁰ em (2013) realizou um estudo para avaliar os efeitos do tempo de pré-irradiação (TPI) sobre a aPDT mediada pela curcumina em células planctônicas e biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. dubliniensis*. Concentrações diferentes de curcumina (5, 10, 20 µM para culturas planctônicas e 20, 30, 40 µM para biofilmes) e TPI de 1, 5, 10 e 20 minutos foram utilizados antes da iluminação (455 nm, 5,28 J/cm²). Amostras adicionais foram tratadas somente com curcumina, somente com luz e amostras controle não receberam luz nem curcumina. As observações feitas por microscopia confocal (CLSM) para todos os micro-organismos demonstraram melhor penetração da curcumina numa concentração de 40 µM em biofilmes depois de 5 e 20 minutos de incubação. A inativação das espécies de *Candida* foi observada somente quando se associou a curcumina com a luz LED. Os diferentes TPI não mostraram

diferenças estatísticas em aPDT mediada pela curcumina. Para as três espécies avaliadas não se verificou crescimento microbiológico para cultura planctônica após a aPDT com a curcumina na concentração de 20 μ M com um TPI de 5, 10 e 20 minutos. Enquanto a curcumina da 5 μ M apresentou uma redução mais baixa independente do TPI, as amostras em biofilme mostraram uma redução significativa no metabolismo depois da aPDT. As três espécies de *Candida* mostraram uma redução maior na viabilidade quando foram associadas a concentrações de 40 μ M e 20 minutos de TPI. Nas observações com CLSM, houve uma maior fluorescência depois da incubação de 20 minutos em comparação com 5 minutos. A fotoinativação de culturas planctônicas não dependeu do TPI. A dependência do TPI dos cultivos de biofilme deferiu entre as espécies avaliadas. Concluiu-se que a aPDT para culturas planctônicas das três espécies avaliadas apresentou um efeito concentração-dependente, porém independente do TPI, além de reduzir o metabolismo dos biofilmes. Intervalos de tempo mais longos são necessários para que a curcumina penetre as estruturas do biofilme.

4 MATERIAL E MÉTODO

4.1 Material

Os equipamentos de proteção individual (EPIs) foram utilizados, tais como máscara, luva, gorro e jaleco durante todos os experimentos microbiológicos. Os experimentos foram realizados na câmara de segurança (BIOSAFE B2, classe XI, SP, Brasil) para a segurança do pesquisador e para evitar contaminações. Todo material foi autoclavado antes e após o uso. Para realizar a fase experimental, os seguintes materiais de consumo, instrumentais e equipamentos foram utilizados:

4.1.1 Material de consumo

- Água destilada.
- Alça de Drigalsky (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Alça de inoculação 10 µL, estéril (Plastbio, Curitiba, PR, Brasil).
- Cepas de *C. albicans* (American Type Culture Collection, ATCC 90028 (CaS), ATCC 96901 (CaR) Rockville, MD, USA).
- Cloreto de Potássio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Cloreto de Sódio (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Cubeta de 2 mL (Cartel, SP, Brasil).
- Curcumina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA ≥ 65% de pureza) C1386.
- Dimetil-sulfóxido (DMSO, Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Fluconazol (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) F8929.
- Fosfato de Potássio dihidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Fosfato de sódio monohidratado (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Glicose (Labsynth Produtos para Laboratório Ltda, Diadema, SP, Brasil).
- Lâmina de vidro (Precision Glass Line).

- Lamínula de vidro (Precision Glass Line).
- Meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0.1 g/L de cloranfenicol (SDA, Acumedia Manufacturers Inc.).
- Meio de cultura Yeast Nitrogen Base (YNB - Difco, Detroit, MI, USA).
- Microtubos tipo Eppendorfs Graduado de 2 mL (Axygen, Curitiba, PR, Brasil).
- Parafilm (Laboratory film 38m X 10cm) (BOECO).
- Placas de 96 poços de fundo “U” e estéril (TPP Techno Plastic Products).
- Placas de Petri 90 X 15 mm descartáveis e estéreis (J Prolab Indústria e Comércio de Produtos para Laboratório Ltda., São José dos Pinhais, PR, Brasil).
- Ponteiros amarelos para micropipeta 20-200 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiros azuis para micropipeta 100-1000 µL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Ponteiros para micropipeta 10 mL (Axygen Scientific, Union City, CA, EUA).
- Pote coletor 50 mL (Alibaba, Shanghai, China).
- Sistema de filtração de 500 mL (Kasvi, China) k15-1500.
- Tubos tipo Falcon de 15 mL, estéril (TPP, Techno Plastic Products, Trasadingen, Suíça).
- Verapamil Hydrochloride (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 1711202.

4.1.2 Instrumentais

- Béquer graduado (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).
- Bico de Bunsen (J.Prolab, São José do Pinhal, Paraná, Brasil).
- Micropipetas de 0,5 – 10 µL, 100-1000 µL e de 20-200 µL (BOECO, Hamburgo, Alemanha).
- Pipetas de 1-10 mL e 1-5 mL (PZ HTL AS, Warsaw, Polônia).
- Provetas graduadas (Vidrolabor, São Paulo, SP, Brasil).

4.1.3 Equipamentos

- Agitador de tubos Modelo: AP 56 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, SP, Brasil).

- Aparelho de luz LED (LXHL-PR09, Luxeon1 III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA) 455 nm, desenvolvido pelo Instituto de Física de São Carlos – USP São Carlos, SP, Brasil.
- Autoclave vertical Modelo: AV 60. N°6614 (Phoenix Ind. e Com. De Equipamentos Científicos Ltda, Araraquara, SP, Brasil).
- Balança de precisão Modelo: BG 400. N°016450 (GEHAKA – Ind. e Com. Eletroeletrônica Gehaka Limitada, São Paulo, SP, Brasil).
- Câmara de fluxo (BIOSAFE B2, SP, Brasil).
- Centrífuga, Modelo: 5810R (Eppendorf AG, Hamburg, Alemanha).
- Contador de colônias CP 600 PLUS, Modelo: CP-600. Nr-série: 919 (Phoenix Indústria e Comércio de Equipamentos Científicos Limitada, Araraquara, São Paulo, Brasil)
- Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (Equipar Ltda, Curitiba, PR, Brasil).
- Estufa bacteriológica Modelo – MA 0324. Série – 9819011 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).
- Estufa para secagem e esterelização Modelo: MA 033. Série: 9819 (Marconi Equipamentos Laboratoriais Ltda, Piracicaba, SP, Brasil).
- Freezer -80°C (Thermo Scientific, USA).
- Incubadora de bancada shaker Modelo: Q816M20 (Quimis Aparelhos Científicos Ltda, Diadema, SP, Brasil)

4.2 Métodos

4.2.1 Preparo dos fármacos

Curcumina (Figura 1) foi utilizada como inibidor dos sistemas de efluxo e FS. Uma solução de curcumina foi preparada em DMSO e então diluída em água destilada para obter 2,5% de DMSO. A concentração de DMSO a 2,5 % foi selecionada com base nos resultados de toxicidade de DMSO para as duas cepas de *C. albicans* que demonstraram ausência de toxicidade. Fluconazol (Figura 2) foi utilizado como agente antifúngico e preparado em Yeast Nitrogen Broth (YNB) com 2,5% de DMSO. Verapamil (Figura 3) foi utilizada como inibidor do sistema de efluxo microbiano e foi dissolvido em

água destilada estéril. Todos os reagentes foram preparados conforme instruções do fabricante.

Figura 1 - Embalagem comercial da curcumina, USA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 2 - Embalagem comercial do fluconazol, USA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 3 - Embalagem comercial do verapamil, USA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.2 Fonte de luz

Um dispositivo de diodos emissores de luz (LED) (Figura 4), composto de oito LEDs (LXHL-PR09, Luxeon1 III Emitter, Lumileds Lighting, San Jose, CA) e com intensidade de iluminação média de 33,58 mW/cm², foi utilizado para ativação do

FS^{29,30}. Esse aparelho apresenta emissão uniforme de 440 a 460 nm (espectro azul), com emissão máxima em 455 nm e foi desenvolvida pelo Instituto de Física de São Carlos. Para o cálculo da dose de luz (fluência), foi utilizada a fórmula:

Fluência (J/cm^2) = Intensidade de luz (W/cm^2) x Tempo de iluminação (segundos)

Figura 4 - Aparelho de Luz LED azul. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.3 Micro-organismos, Condições de Cultivo e Desenvolvimento de Culturas Planctônicas

Uma cepa padrão susceptível (ATCC 90028, CaS) e outra padrão resistente a fluconazol (ATCC 96901, CaR) de *C. albicans* foram avaliadas. A cultura desses micro-organismos foi armazenada em microtubos contendo meio de cultura YNB acrescido de glicerol e congelada à $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até o momento de sua utilização. Previamente a cada experimento, as leveduras foram descongeladas e inoculadas individualmente por meio da técnica de esgotamento em quadrante no meio de cultura Sabouraud Dextrose Agar com 0.1 g/L de cloranfenicol e incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 48 horas para sua reativação. Em seguida, com uma alça descartável estéril, cinco colônias de cada cepa foram inoculadas individualmente em um tubo com 10 mL de meio Yeast Nitrogen Broth com 100 mM de glicose (YNB) e incubadas a 37°C *overnight* (16 horas). Para avaliar a possibilidade de contaminação da cultura, após o período de incubação, $10\text{ }\mu\text{L}$ de cada suspensão microbiana foi pipetada individualmente sobre uma lâmina de vidro que foi recoberta por uma lamínula para observação em microscópio óptico.

Para avaliar a pureza da cultura e possibilidade de contaminação (presença de outras espécies e/ou variações morfológicas atípicas das células fúngicas), na ausência de contaminação, os pré-inóculos foram diluídos em duas razões (1:10 e 1:20) em médio de YNB fresco para realização do inóculo. Sendo assim, para diluir na razão de 1:20, 500 µL do pré-inóculo foram pipetados em um tubo com 9,5 mL de meio líquido para as duas cepas de *C. albicans*. Na diluição na razão de 1:10, 1000 µL do pré-inóculo foram pipetados em um tubo de 9,0 mL de YNB.

Alíquotas de 1 mL de cada diluição das duas cepas de *C. albicans* foram então transferidas para cubetas de 1,5 mL e levada ao espectrofotômetro (Figura 5) para leitura da densidade óptica (DO_0) das diluições com comprimento de onda utilizado de 540 nm. Os tubos dos inóculos foram em seguida incubados em estufa aeróbia a 37° C para o crescimento dos micro-organismos até a fase *mid-log* de crescimento. Após 8 horas de incubação, a DO_1 final dos micro-organismos foi novamente lida conforme descrito anteriormente, e o valor da DO_1 final foi subtraído da DO_0 inicial (ΔDO). Esse valor de ΔDO foi utilizado para se selecionar um dos inóculos dos micro-organismos para ser utilizado como inóculo inicial. Nesse ponto de crescimento, o valor médio de ΔDO para CaS foi 0,606 u.a. que correspondeu a um valor médio de $6,70 \times 10^{-6}$ unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) e para CaR o valor médio de ΔDO foi 0,500 u.a., o que correspondeu a um valor médio de $5,33 \times 10^{-6}$ UFC/mL.

Figura 5 - Espectrofotômetro – Biospectro Modelo: SP-220 (450 nm). Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

4.2.4 Toxicidade de DMSO

As duas cepas de *C. albicans* foram cultivadas e padronizada 10^{-6} UFC/mL, alíquotas de 300 μ L de cada suspensão individualmente foram transferidas para um tubo Falcon com 2.700 mL de médio de cultura YNB, os quais foram agitados por 1 minuto, em seguida 300 μ L dessa solução foi transferida a um outro tubo Falcon contendo 2.700 mL de YNB realizando-se assim diluições seriadas decimas. Foram feitas três diluições seriadas para se atingir a concentração final de $0,5-2,5 \times 10^{-3}$ UFC/mL, recomendada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*¹⁴. Alíquotas de 100 μ L de cada suspensão fúngica foram transferidas individualmente para orifícios de uma placa de cultura de 96 poços de fundo em “U” e foram incubadas com 100 μ L em diferentes diluições de DMSO: 100; 50; 25; 12,5; 10; 6,25; 5; 2,5%, e as amostras controles receberam YNB ao invés de DMSO. Em seguida foram incubadas na estufa a 37° C por 24 horas. As amostras foram diluídas em solução salina tamponada de fosfato (PBS, (PBS, água destilada 100 mL, 0,4% de NaCL, 0,012% de KH₂PO₄, 0,010% de KCl, 0,072% de Na₂HPO₄, pH 7,2) e plaqueadas em SDA e incubadas durante 48 horas para quantificação de UFC/mL.

4.2.5 Terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT):

Alíquotas de 100 μ L da suspensão fúngica de cada cepa avaliada padronizada 10^{-6} UFC/mL foram individualmente transferidas para orifícios de uma placa de cultura de 96 poços de fundo plano. Para realização da aPDT (grupo C+L+), o mesmo volume (100 μ L) de curcumina na concentração 80 μ M com 5% DMSO foi pipetado sobre esses poços de forma a se obter uma concentração final de curcumina de 40 μ M com 2,5% DMSO, e as amostras foram incubadas no escuro por 5 minutos (tempo de pré-irradiação, TPI). Depois desse tempo, as placas foram iluminadas com luz LED a 5,28 J/cm^{29,30}, correspondente a 2 minutos e 36 segundos (2,6 minutos). Para avaliar o efeito toxico do FS, amostras adicionais foram tratadas somente com curcumina no escuro (grupo C+L-) pelo mesmo período de tempo de fotossensibilização e iluminação (total de 7,6 minutos). Também foi avaliado o efeito da luz LED (5,28 J/cm²) sozinha, no qual as amostras foram incubadas com PBS pelo mesmo tempo de fotossensibilização e

iluminação na ausência de FS (7,6 minutos, grupo C-L+). O grupo controle não recebeu nenhum tratamento, somente PBS por 7,6 minutos (C-L-).

4.2.6 Contagem do número de colônias viáveis

Após o tratamento de cada um dos grupos, alíquotas de 100 µL de cada suspensão foram transferidas individualmente para um tubo *eppendorf* com 900 µL de PBS, os quais foram vigorosamente agitados por 1 minuto, em seguida 100 µL dessa solução foi transferida a um outro tubo *eppendorf* contendo 900 µL de PBS, realizando-se assim diluições seriadas decimas. Esse procedimento foi realizado quatro vezes para cada amostra e, desta forma, as diluições seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} foram obtidas. As diluições seriadas (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} e 10^{-4} , Figura 6) foram utilizadas para a realização da semeadura nas placas de Petri contendo o meio de cultura SDA. Para este procedimento, os tubos contendo as diluições seriadas foram individualmente agitados e alíquotas de 25 µL de cada uma dessas diluições foram pipetadas em duplicata (Figura 7). Uma alça de Drigalsky estéril foi utilizada para espalhar a solução sobre o meio de cultura em cada quadrante da placa, e incubadas na estufa a 37° C por 48 horas. Após a incubação, foi realizada a quantificação das colônias. Para o cálculo desses valores, as colônias viáveis presentes nas placas de Petri de cada duplicata foram contadas usando um contador de colônias digital. Após a contagem, foi obtida a média entre as duplicatas de cada amostra e o número de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC/mL) foi calculado. Para o cálculo de UFC/mL, utilizou-se a fórmula a seguir:

$$\text{UFC/mL} = \frac{\text{Média do n}^\circ \text{ de colônias} \times (10^n)}{p}$$

n = valor absoluto da diluição (1, 2, 3 ou 4)

p = 0,025 µL (volume da diluição que foi pipetado nas placas)

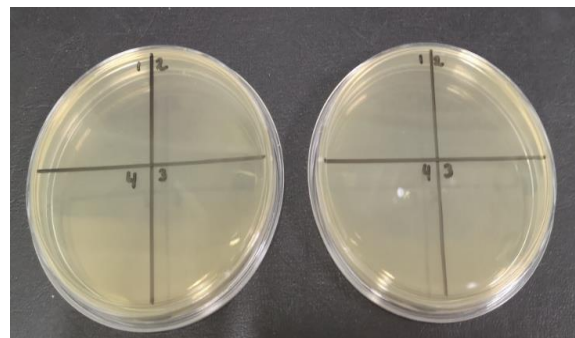
Os valores de UFC/mL obtidos foram deixados em notação científica.

Figura 6 - Diluições seriadas referentes à um grupo de amostra. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

Figura 7 - Aliquotas de 25 µL de cada diluições foram transferidas á placas Petri de SDA. Faculdade de Odontologia de Araraquara, 2018.



Fonte: Arquivo pessoal do autor.

No Quadro 1, observa-se os grupos experimentais citados acima. Para realização dos experimentos, os 16 poços de cada placa contendo cultura planctônica foram divididos em 4 grupos com 4 poços cada.

Quadro 1 – Divisão das condições experimentais para cada cepa.

Grupos: CaS/CaR	Condições Experimentais
C+L+	Curcumina e luz LED (aPDT)
C+L-	Tratados somente com curcumina
C-L+	Tratados somente com luz LED (5,28 J/cm ²)
C-L-	Amostras tratadas com PBS (Grupo controle)

CaS: *C. albicans* susceptível a fluconazol; CaR: *C. albicans* resistente a fluconazol.

Fonte: Elaboração do autor.

4.2.7 Teste de susceptibilidade

A susceptibilidade ao fluconazol, verapamil e curcumina das suspensões fúngicas de cada cepa foi avaliada por meio do teste de microdiluição para determinação da CIM e da Concentração Fungicida Mínima (CFM) de acordo com as normas do *Clinical and Laboratory Standard Institute*¹⁴ com modificação. As duas cepas de *C. albicans* foram cultivadas e padronizadas 10⁻⁶ UFC/mL, em seguida para o ajuste

do inóculo foram feitas três diluições seriadas decimas, e padronizadas numa concentração final de $0,5-2,5 \times 10^{-3}$ UFC/mL¹⁴ na presença do fármaco. Após do ajuste do inóculo, para determinar a sua concentração, foram feitas duas diluições (10^{-0} e 10^{-1}) e transferidas 25 µL numa placa petri com médio SDA e incubadas na estufa por 48 horas. O Fluconazol foi preparado numa concentração de 5% de DMSO com 95% de meio de cultivo YNB, a curcumina foi preparada numa concentração de 5 % de DMSO e diluída com 95% de água destilada e o verapamil foi preparado somente com água destilada. Cada fármaco foi pesado no dobro das concentrações indicadas (Quadro 2), uma vez que sua concentração era reduzida pela metade quando adicionado ao inóculo fúngico. Em seguida 100 µL de diluições seriadas dos fármacos foram transferidos individualmente para placas de cultura de 96 poços de fundo em “U”, e posteriormente alíquotas de 100 µL de cada suspensão fúngica foram transferidas individualmente, resultando assim numa concentração final de 2,5% DMSO e da metade da concentração preparada dos fármacos e do inóculo fúngico. Todas as amostras foram incubadas na estufa a 37° C por 24 horas.

Quadro 2 – Concentrações dos fármacos para as cepas CaS e CaR utilizadas no teste de susceptibilidade.

Fármacos	CaS	CaR
Curcumina	5.120; 2.560; 1.280; 640; 320; 160; 80; 40; 20; 10 µM (1.886,10; 94305; 471,53; 235,76; 117,88; 58,94; 29,47; 14,73; 7,37; 3,68 µg/mL)	5.120, 2.560, 1.280, 640, 320, 160, 80, 40 µM (1.886,10; 943,05; 471,53; 235,76; 117,88; 58,94; 29,47; 14,73 µg/mL)
Verapamil	4; 2 mg/mL (4.000; 2.000 µg/mL)	4; 2 mg/mL (4.000; 2.000 µg/mL)
Fluconazol	4; 2; 1; 0,5; 0,25 µg/mL	1.024; 512; 128; 64 µg/mL

CaS: *C. albicans* susceptível a fluconazol; CaR: *C. albicans* resistente a fluconazol.

Fonte: Elaboração do autor,

Amostras controles receberam o inóculo fúngico e meio YNB ao invés dos fármacos e o “branco” consistiu do veículo dos fármacos somente (YNB ou água destilada com DMSO). Após incubação, foi feita leitura visual. A menor concentração

de fluconazol, verapamil e curcumina que promoveu a inibição do crescimento fúngico (ausência de turvação no valor de DO) foi considerada a CIM. Todas as amostras de verapamil e fluconazol foram plaqueadas. Para curcumina, somente as concentrações 10, 20, 40 μM para CaS e 5120 μM para CaR foram plaqueadas em virtude da cor da curcumina não possibilitar a leitura de absorbância das amostras. Todos os controles também foram plaqueados. Para o plaqueamento, as amostras foram diluídas em PBS (10^{-0} até 10^{-3}) e semeadas em placas de SDA, que foram incubados na estufa por 48 horas a 37°C para crescimento de colônias (UFC/mL). A menor concentração de fluconazol, verapamil e curcumina que inibiu o crescimento de colônias foi considerada como a CFM para cada agente testado.

4.2.8 Inibição de sistemas de efluxo

Definidos os parâmetros de CIM e CFM, as duas cepas de *C. albicans* foram cultivadas e padronizadas numa concentração final de $0,5\text{-}2,5 \times 10^{-3}$ UFC/mL (juntamente com os fármacos)¹⁴. Para o preparo dos fármacos foram pesados o dobro da CIM de cada um deles (curcumina e fluconazol) foram diluídos com DMSO numa concentração final de 5% DMSO para curcumina + fluconazol e 10% DMSO para verapamil + fluconazol. O verapamil foi diluído em água destilada estéril. Em seguida, para a associação dos fármacos, 50 μL de curcumina ou verapamil foram transferidas individualmente para placas de cultura de 96 poços de fundo em “U” e 50 μL de fluconazol foi em seguida adicionado. Para a associação de curcumina + verapamil + fluconazol, foi pesada primeira a curcumina para depois ser pesado o fluconazol, os quais foram diluídos juntos em 5% DMSO e meio de cultura. Foram transferidos 50 μL de curcumina com fluconazol e 50 μL de verapamil para os poços da placa de microtitulação de 96 poços. Posteriormente, alíquotas de 100 μL de cada suspensão fúngica foram transferidas de modo que as concentrações dos fármacos finais, já com o inóculo de *C. albicans*, fossem sub-CIM (Quadro 3) e totalizando assim 200 μL para cada poço. No caso dos fármacos diluídos em DMSO, a concentração final do DMSO foi mantida em 2,5% já com a associação das substâncias e do inóculo fúngico. Assim, a curcumina + fluconazol ou verapamil + fluconazol ou curcumina + verapamil + fluconazol foram associados em valores sub-CIM (Quadro 4).

Quadro 3 – Concentrações sub-CIM dos fármacos para CaS e CaR a fluconazol.

<i>C. albicans</i>	Curcumina	Verapamil	Fluconazol
CaS	10 μ M	2 mg/mL	0,25 μ g/mL
CaR	*	2 mg/mL	64 μ g/mL

CaS: *C. albicans* susceptível a fluconazol; CaR: *C. albicans* resistente a fluconazol, *: valor não encontrado.

Fonte: Elaboração do autor.

Quadro 4 – Concentrações das associações dos fármacos em sub-CIM para CaS e CaR a fluconazol.

	CaS	CaR
Curcumina + Fluconazol	10 μ M + 0,25 μ g/mL	40 μ M + 64 μ g/mL
Verapamil + Fluconazol	2 mg/mL + 0,25 μ g/mL	2 mg/mL + 64 μ g/mL
Curcumina + Verapamil + Fluconazol	10 μ M + 2 mg/mL + 0,25 μ g/mL	40 μ M + 2 mg/mL + 64 μ g/mL

CaS: *C. albicans* susceptível a fluconazol; CaR: *C. albicans* resistente a fluconazol.

Fonte: Elaboração do autor,

Amostras controles receberam YNB e inóculo fúngico e “branco” consistiu do veículo da combinação dos fármacos (água destilada ou YNB com DMSO) somente. As amostras foram incubadas na estufa a 37° C por 24 horas. Em seguida foi feita leitura visual e todas as amostras que apresentaram ausência de turbidez na leitura visual e os controles foram diluídos em solução tampão (PBS) (10^0 até 10^{-3}), plaqueados em SDA e incubados durante 48 horas para quantificação de colônias (UFC/mL).

4.3 Análise Estatística

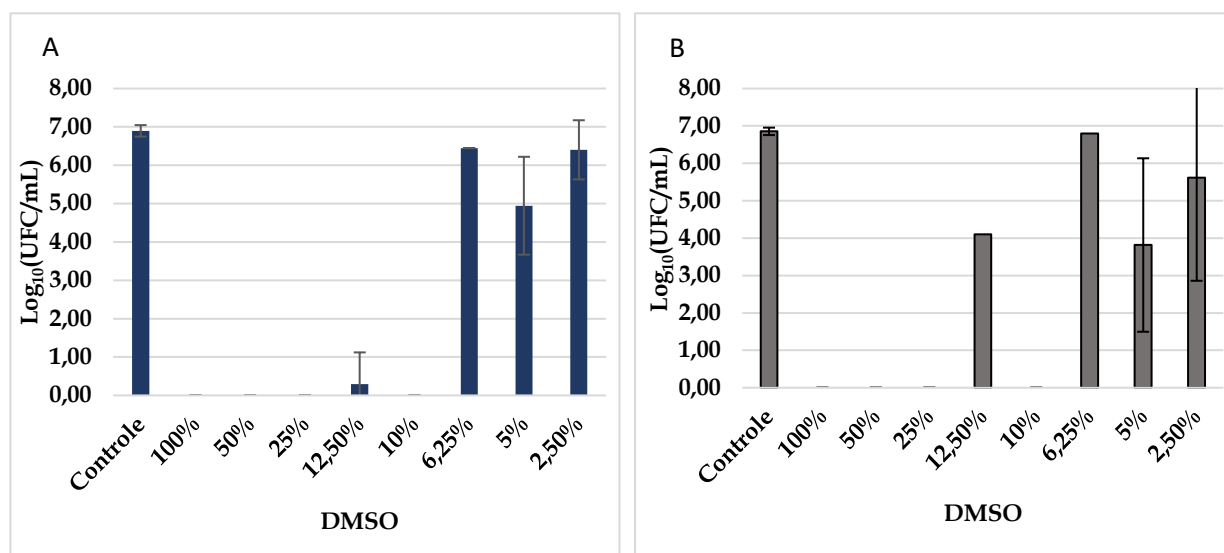
Esse é um estudo experimental *in vitro* com uma variável quantitativa dependente (UFC/mL) e duas variáveis independentes (cepas de *C. albicans* e inibidores do sistema de efluxo). Todos os experimentos com culturas planctônicas foram realizados em quadruplicatas para cada grupo e em três ocasiões distintas (n=12). Inicialmente, foi feita uma análise exploratória dos dados (estatística descritiva) com medidas de resumo (tendência central e de dispersão). Para a análise inferencial dos dados, inicialmente a normalidade e a homogeneidade de variâncias foram avaliadas pelos testes de Shapiro-Wilk e Levene, respectivamente. Para os dados que não seguiram a distribuição normal, os valores de UFC/mL foram convertidos em logarítmo na base 10. Posteriormente, em caso de dados com distribuição normal, estes foram apresentados na forma de média e desvio-padrão e uma análise paramétrica foi utilizada para se avaliar o efeito dos inibidores de efluxo nas duas cepas de *C. albicans* submetidas tanto ao fluconazol como à aPDT. Em caso de distribuição não normal dos dados, estes foram apresentados na forma de diagrama de caixas (*box-plots*) e uma análise não paramétrica foi realizada. Os dados foram analisados pelos testes paramétricos t de Student, ANOVA com correção de Welch e *post-hoc* de Games-Howell e pelo teste não paramétrico de Mann-Whitney. O nível de significância adotado foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Toxicidade de DMSO

A concentração não tóxica de DMSO para as suspensões fúngicas foi de 2,5%. É importante ressaltar que, com concentrações menores que 2,5%, não foi possível dissolver a curcumina (Figura 8).

Figura 8 - Valores médios (UFC/mL) obtidos para CaS (A) e CaR (B) submetidas a diferentes concentrações de DMSO (n=5).

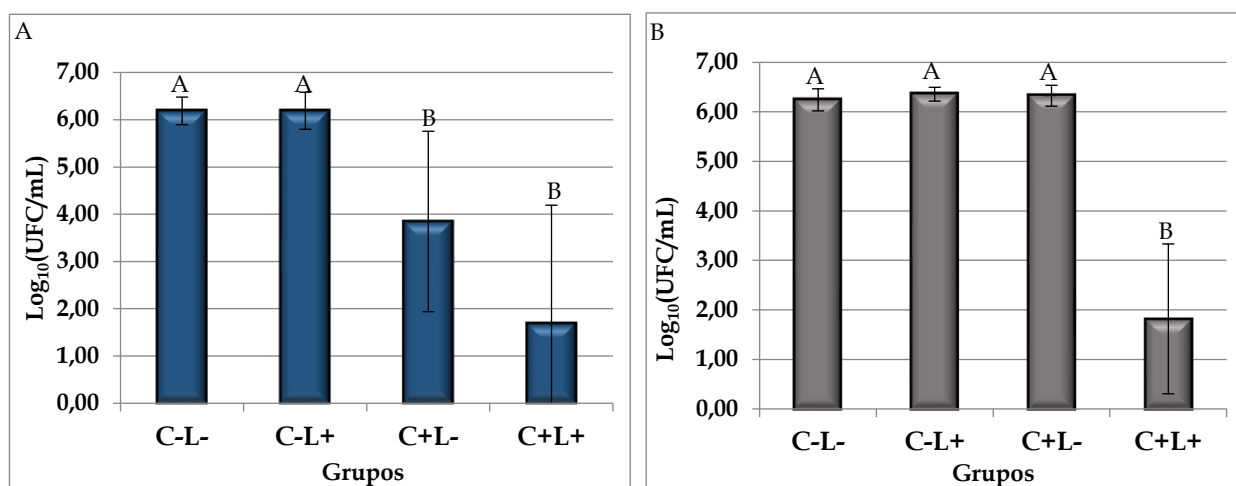


Fonte: Elaboração do autor

5.2 Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

Os resultados da ANOVA/Welch para CaS e CaR (APÊNDICE A1) demonstraram diferenças significativas entre os grupos. Na Figura 9, observa-se que somente a curcumina (grupo C+L-) a 40 µM promoveu redução significativa ($p=0,006$) de 2,34 log₁₀ da cepa CaS, porém nenhuma redução foi verificada para a cepa CaR ($p=0,617$) quando comparadas com seus respectivos controles (C-L-). Quando a curcumina foi associada à luz (5,28 J/cm² equivalente a 2,6 minutos) (grupo C+L+, aPDT), tanto a cepa susceptível como a resistente apresentaram reduções significativas ($p<0,001$) de 4,50 e 4,42 log₁₀, respectivamente, em relação aos seus respectivos controles (C-L-). Para ambas as cepas, o tratamento somente com luz de LED (grupo C-L+) não apresentou diferença em relação ao controle ($p\geq 0,331$).

Figura 9 - Valores médios de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos para as cepas susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol submetidas à aPDT mediada por curcumina a 40 μM e luz LED a 5,28 J/cm^2 . Barras de erro: desvio-padrão ($n=12$). Letras diferentes denotam diferença estatística significativa entre os grupos ($p \leq 0,006$).



Fonte: Elaboração do autor

5.3 CIM e CFM de Fluconazol, Verapamil e Curcumina

Foram obtidos os valores de CIM e CFM de verapamil, curcumina e fluconazol para culturas planctônicas de CaS e CaR. Os valores de CIM de fluconazol, curcumina e verapamil para as cepas de CaS e CaR estão apresentados na (Tabela 1). Nenhuma concentração das três drogas foi fungicida (promoveu completa inativação das cepas avaliadas), mas promoveu redução significativa do crescimento (APÊNDICE A2, A3, A4). Para CaR, nenhuma concentração de curcumina foi fungistática, e os resultados apresentaram uma variação muito grande. Os valores de UFC/mL obtidos com fluconazol, curcumina e verapamil para ambas as cepas de *C. albicans* estão apresentados nas Figuras 10,11, 12 respectivamente.

Tabela 1 - Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de fluconazol, curcumina e verapamil obtidos para ambas as cepas de *C. albicans*. Os valores entre parênteses mostram a redução em log obtida em relação ao controle (sem fármaco).

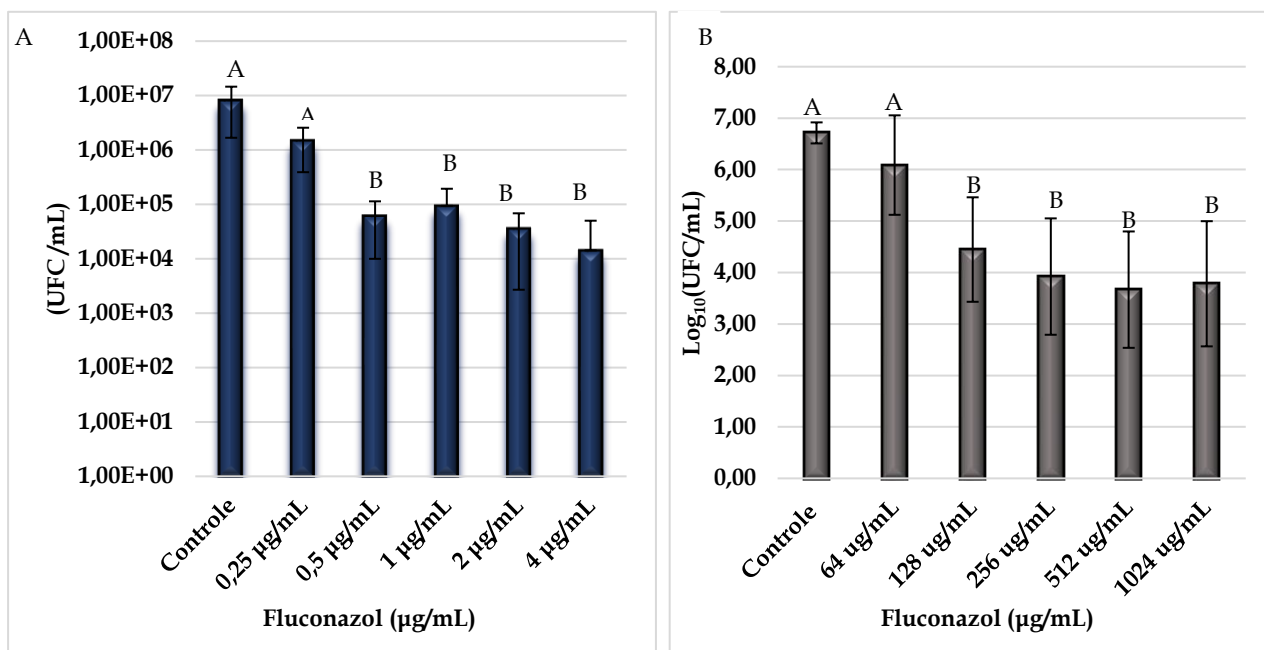
<i>C. albicans</i>	Fluconazol	Curcumina	Verapamil
CaS (ATCC 90028)	0,5 µg/mL (0,8 log ₁₀)	20 µM (1,40 log ₁₀)	4 mg/mL (4,05 log ₁₀)
CaR (ATCC 96901)	128 µg/mL (2,27 log ₁₀)	*	4 mg/mL (1,74 log ₁₀)

CaS: *C. albicans* susceptível a fluconazol; CaR: *C. albicans* resistente a fluconazol. *: valor não encontrado.

Fonte: Elaboração do autor

Reduções significativas de UFC/mL após incubação com fluconazol em concentrações $\geq 0,5$ µg/mL ($p \leq 0,045$) e ≥ 128 µg / mL ($p < 0,001$) foram encontradas para CaS (1,94 a 2,76 log₁₀) e CaR (2,27 para 2,93 log₁₀), respectivamente, em comparação com o controle (sem fármaco) (Figura 10).

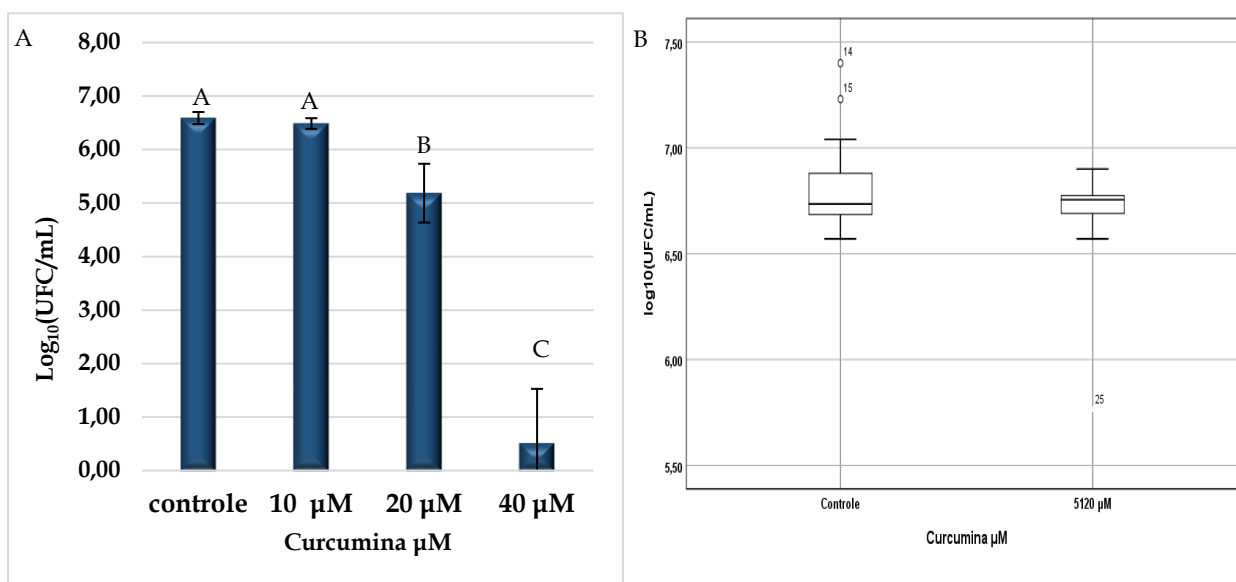
Figura 10 - Valores médios de log₁₀(UFC/mL) obtidos para concentrações avaliadas de fluconazol na determinação do CFM para as cepas de *C. albicans* susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol. Barras de erro: desvio-padrão (n=12). Letras diferentes denotam diferença estatística significativa entre os grupos ($p \leq 0,045$).



Fonte: Elaboração do autor

Para a curcumina, foram observadas reduções significativas nos valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) (1,40 a 6,06 $\log_{10}$, $p < 0,001$) apenas para a CaS, em concentrações $\geq 20 \mu\text{M}$. Para CaR, mesmo a maior concentração de curcumina resultou em valores semelhantes ao controle (Figura 11).

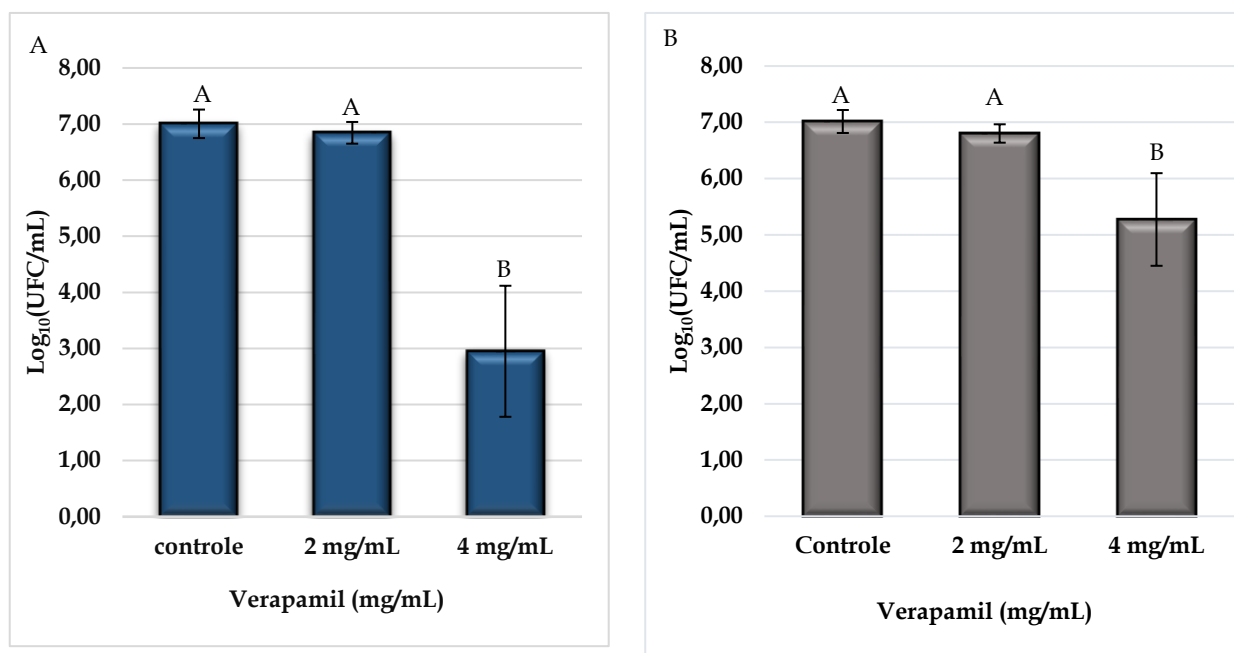
Figura 11 - (A) Valores médios de $\log_{10}$ (UFC/mL) e desvio-padrão (barras de erro) obtidos para concentrações avaliadas de curcumina na determinação do CFM para as cepas de *C. albicans* susceptível ao fluconazol. (B) Mediana (traços horizontais), primeiro (caixa inferior) e terceiro (caixa superior) quartis, valores mínimos e máximos (barras de erro) e outliers (* °). Letras diferentes denotam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,001$) ($n=12$).



Fonte: Elaboração do autor

O verapamil foi avaliado e apenas na concentração de 4 mg/mL foi observada redução significativa nos valores de $\log_{10}$ (UFC/mL) de CaS (4,05 $\log_{10}$, $p < 0,001$) e CaR (1,74 $\log_{10}$, $p < 0,001$) (Figura 12).

Figura 12 - Valores médios de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos para concentrações avaliadas de verapamil na determinação do CFM para as cepas de *C. albicans* susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol. Barras de erro: desvio-padrão (n=13). Letras diferentes denotam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,001$).



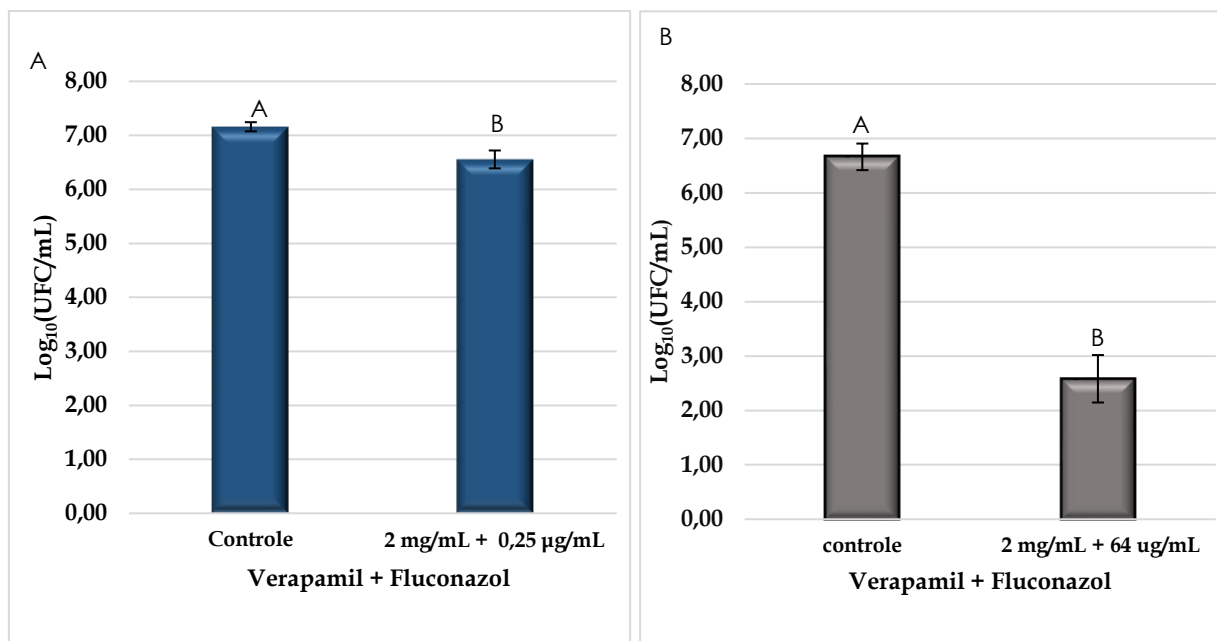
Fonte: Elaboração do autor

5.4 Inibição de sistemas de efluxo

Com base nesses resultados, os inibidores do sistema de efluxo (curcumina e verapamil) foram associados com o fluconazol em concentrações não letais (sub-CIM). Assim, foi utilizada a concentração de 2 mg/mL de verapamil para ambas as cepas de *C. albicans*, a curcumina foi utilizada nas concentrações de 10 e 40 μM para CaS e CaR, respectivamente, e o fluconazol, nas concentrações de 0,25 e 64 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Para a associação do verapamil com o fluconazol, foram observadas reduções significativas de UFC/mL após incubação (APENDICE A5). Para CaS a redução foi de 0,59 $\log_{10}$ ($p < 0,001$) e para CaR, de 4,08 $\log_{10}$ ($p < 0,001$), em comparação com o controle (sem fármaco) (Figura 13).

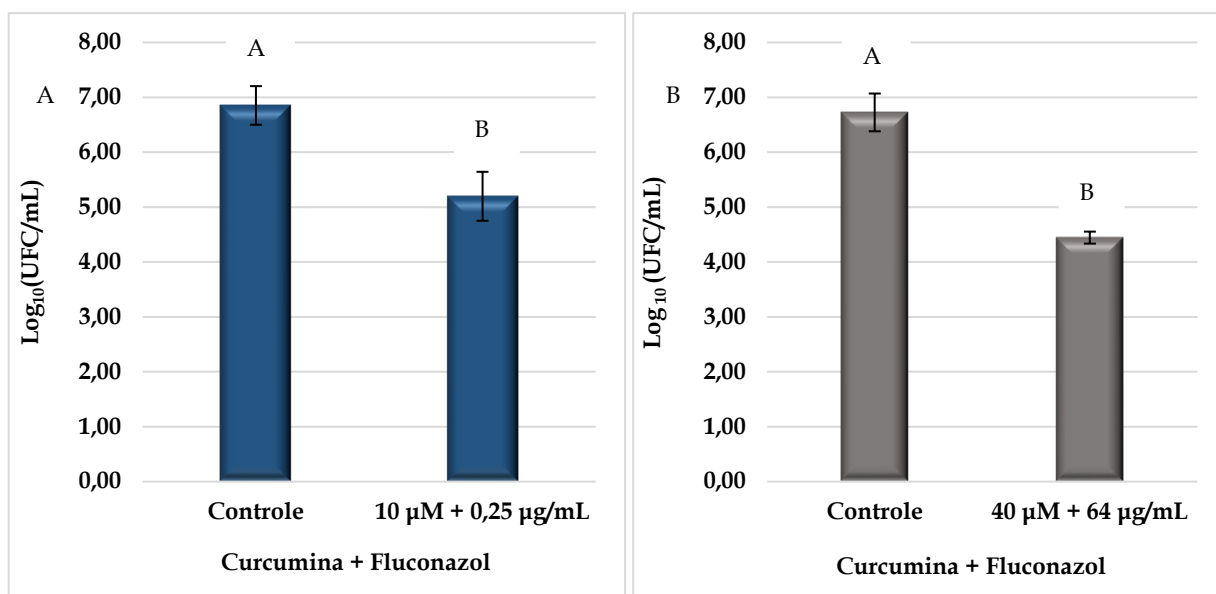
Figura 13 - Valores médios de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos para associação de verapamil e fluconazol para as cepas de *C. albicans* susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol. Barras de erro: desvio-padrão (n=12). Letras diferentes denotam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,001$).



Fonte: Elaboração do autor

Reduções significativas de UFC/mL foram encontradas na associação da curcumina com o fluconazol (APÊNDICE A6). Após incubação, a curcumina com o fluconazol para CaS reduziu 1,58 $\log_{10}$ ($p < 0,001$) e para CaR, 2,28 $\log_{10}$ ($p < 0,001$), em comparação com o controle (sem fármaco) (Figura 14).

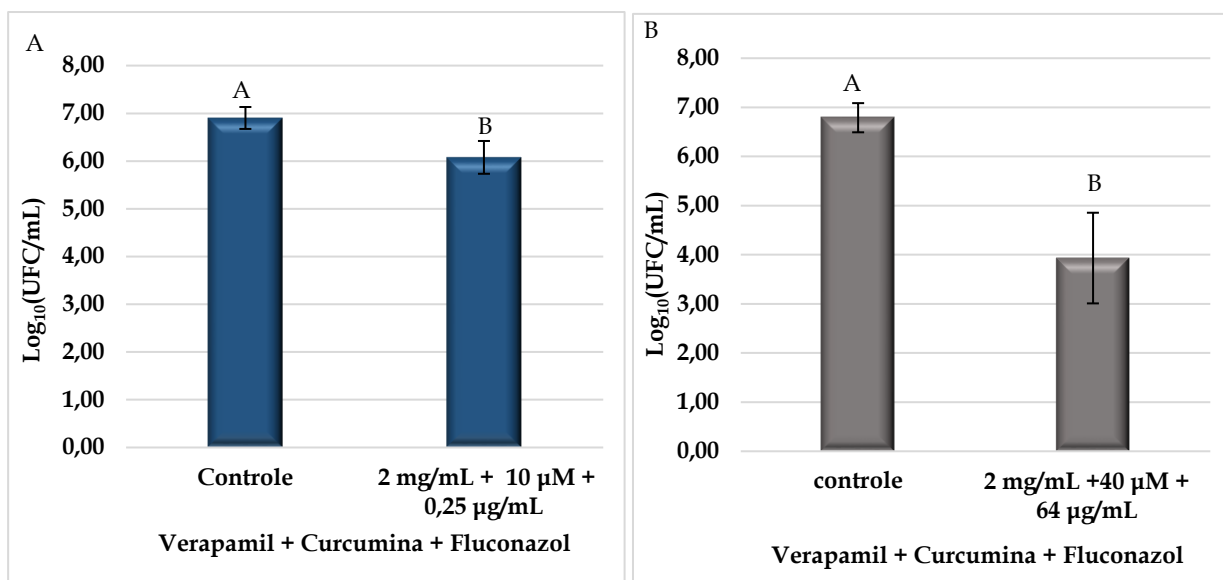
Figura 14 - Valores médios de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ obtidos para associação de curcumina e fluconazol para as cepas de *C. albicans* susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol. Barras de erro: desvio-padrão (n=12). Letras diferentes denotam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,001$).



Fonte: Elaboração do autor

Quando os dois inibidores dos sistemas de efluxo (curcumina e verapamil) foram associados com o fluconazol, foram observadas reduções significativas de UFC/mL e $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ (APÊNDICE A7). Após incubação, para CaS houve redução de 0,77 $\log_{10}$ ($p < 0,001$) e para CaR, de 2,86 $\log_{10}$ ($p < 0,001$), em comparação com o controle (Figura 15).

Figura 15 - Valores médios de (UFC/mL) obtidos para associação de verapamil, curcumina e fluconazol para as cepas de *C. albicans* susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol. Barras de erro: desvio-padrão (n=12). Letras diferentes denotam diferença estatística significativa entre os grupos ($p < 0,001$).



Fonte: Elaboração do autor

6 DISCUSSÃO

A resistência aos antimicrobianos é um problema de saúde pública condicionado pelo uso excessivo de antimicrobianos. Assim, novas terapias para superar esse tipo de resistência, como o uso de novos compostos capazes de inibir as bombas de efluxo combinadas com os azóis, e métodos alternativos como aPDT, poderiam ser uma possibilidade relevante.

Neste estudo foi verificado em culturas planctônicas que aPDT mediada pela curcumina na concentração de 40 μM na associação com luz LED 5,28 J/cm^2 promoveu redução significativas na viabilidade das duas cepas de *C. albicans* (4,50 e 4,42 $\log_{10}$ para CaS e CaR, respectivamente). Portanto a susceptibilidade de CaR à aPDT foi semelhante à de CaS. Até onde sabemos, não há estudo publicado anteriormente investigando os efeitos fotodinâmicos da curcumina contra *C. albicans* resistente ao fluconazol. Porém esses resultados diferem de dados anteriores de Dovigo et al.²⁹ em cultura planctônica quando a curcumina foi usada numa concentração de 20 μM com a mínima fluência de luz LED 5,28 J/cm^2 (5 e 20 minutos de tempo de pré-irradiação), resultando em inativação completa de *C. albicans* susceptível ao fluconazol. Em outra investigação realizado por Andrade et al.⁶⁰, foi verificado que a aPDT em cultura planctônica mediada pela curcumina 20 μM em associação com luz LED (5,28 J/cm^2) resultou numa inativação completa de *C. albicans*, e o grupo que recebeu só curcumina não apresentou efeito nenhum em comparação com seu respectivo controle. Essas diferenças de resultados podem ser atribuídas às diferenças metodológicas entre os estudos: enquanto esses autores avaliaram um inóculo fúngico *overnight* preparado com o meio de cultura *Trypticase Soy Broth* e a curcumina foi preparada em 10% de DMSO numa concentração não tóxica para o inóculo, no presente estudo o inóculo foi preparado na fase *mid-log* em meio de cultura YNB e a curcumina foi preparada numa concentração de DMSO não tóxica de 2,5%. No entanto no presente estudo a propriedade antimicrobiana da curcumina sem luz foi observada e está de acordo com outra investigação realizada por Martins, porém só foi observada para CaS que reduziu 2,34 $\log_{10}$ em comparação com seu grupo controle, mas não foi observada para CaR.

Os resultados desta investigação demonstraram que as CIMs para CaS e CaR para o fluconazol foram de 0,5 e 128 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, para a curcumina a CIM foi de 20 μM para CaS, e para o verapamil a CIM foi de 2 mg/mL para ambas as cepas. Para CaS, todos os fármacos foram fungistáticos. Para CaR, nenhuma concentração de curcumina foi fungistática, esse dado não foi esperado, mas concentrações maiores testadas não puderam ser dissolvidas em 2,5 % de DMSO.

No ensaio de aPDT, para CaS a curcumina 40 μM sozinha reduziu 2,34 $\log_{10}$, enquanto que no ensaio de CIM/CFM a redução foi de 6,06 $\log_{10}$ na mesma concentração. Essa diferença de redução pode ser justificada pelo tempo de incubação de CaS com a curcumina, pois enquanto que no ensaio de aPDT esse tempo foi de 7,6 minutos, no ensaio de CIM/CFM esse tempo foi de 24 horas. Os resultados de CIM desta investigação diferem com os de Martins et al.³¹ no qual a concentrações inibitórias para *C. albicans* de curcumina foi de 64 mg/L (173,73 μM) e de fluconazol foi de 2 mg/L essa diferença poderia ser atribuída pela diferente cepa utilizada de CaS (ATCC 18804) e o meio de cultura *Trypticase Soy Broth* que foram utilizados nesse estudo.

A associação do verapamil ou curcumina ao fluconazol reverteu a resistência de *C. albicans* ao fluconazol em culturas planctônicas, uma vez que a concentração sub-CIM de fluconazol 64 $\mu\text{g/mL}$ promoveu reduções significativas de $\log_{10}(\text{UFC/mL})$ quando combinadas com concentrações sub-CIM de verapamil 2 mg/mL e curcumina 40 μM . Quando comparados os valores das reduções, é possível verificar que a associação do verapamil ao fluconazol foi mais efetiva do que a curcumina com o fluconazol (4,08 $\log_{10}$ versus 2,28 $\log_{10}$, respectivamente). Portanto, este resultado demonstrou que o verapamil foi mais eficaz que a curcumina na inibição dos sistemas de efluxo de CaR e aumentou sua susceptibilidade ao fluconazol.

Esses resultados corroboram com estudo anterior Yu et al.³⁶, quando o verapamil foi avaliado com fluconazol na formação de biofilme de *C. albicans*. Nesse estudo, o MIC₅₀ do verapamil foi reduzido de 160 mg/L para 20 mg/L. Nos biofilmes pré-formados (maduros), o CIM₅₀ do verapamil e fluconazol foram reduzidos de 320 para 80 mg/L e de >256 para 0,5 mg/L, respectivamente. No entanto, a CIM foi avaliada pela atividade metabólica (ensaio XTT). Concentrações de 160-1280 mg/L de verapamil isolado reduziram a atividade metabólica em mais de 60% no biofilme. Por outro lado, no presente estudo, apenas uma concentração maior de verapamil (4 mg/mL ou 4.000

mg/L) resultou na inibição do crescimento fúngico. Essa diferença pode ser atribuída ao método utilizado para avaliar o efeito da droga, já que o presente estudo utilizou a quantificação de colônias ao invés de atividade metabólica. Também pode ser corroborados com os resultados de Pina et al.³³ quando o verapamil foi associada com fluconazol em concentrações sub-CIMs (fluconazol 8 mg/L ou 8.000 µg/mL em cepa susceptível; e 64 mg/L ou 64.000 µg/mL em resistente, e o verapamil 100 µM ou 45.46 µg/mL como modulador das bombas de efluxo), sendo que o verapamil demonstrou ser eficaz para reverter a resistência ao fluconazol. Mas difere do estudo de Nazik et al.⁵⁶ que usaram o verapamil em combinação com voriconazol em concentrações sub-CIM contra *A. fumigatus*. A concentração do verapamil para biofilme pré-formado foi de 7,8 µg/mL e para formação de biofilme foi de 39 µg/mL. Para o voriconazol, as concentrações de 0,125-2 µg/mL resultaram em inibição consistente de biofilme pré-formado e em formação. Esse estudo não mostrou nenhum efeito da associação dos fármacos tanto para biofilme pré-formado como na formação do biofilme de *A. fumigatus*. Porém o presente estudo mostrou ação sinérgica do verapamil com o fluconazol, reduzindo a viabilidade para as duas cepas de *C. albicans*. Essa diferença nos resultados pode ser atribuída pela diferença dos azóis utilizados nas duas investigações, além das espécies fúngicas avaliadas e das formas de cultivo (planctônico X biofilme). Por outro lado, o verapamil nesse estudo foi diluído com DMSO e preparada em água destilada, enquanto que no presente estudo o verapamil foi preparado somente com água destilada, como recomendado pelo fabricante.

Em outro estudo, Sharma et al.³⁵ avaliaram uma cepa de *Saccharomyces cerevisiae* com superexpressão das bombas de efluxo de *C. albicans* na maioria dos ensaios. Foi demonstrado que a curcumina utilizada como inibidor da bomba de efluxo, na concentração de 100 µM, foi seletiva para os transportadores ABC de *C. albicans*, atuando como inibidor competitivo do sistema de efluxo com sinergismo com cetoconazol, itraconazol e miconazol, mas não com fluconazol. Este resultado não corrobora com o observado na presente investigação, quando a curcumina 100 µM aumentou a susceptibilidade de *C. albicans* resistente ao fluconazol. Essa diferença pode ser explicada pelas diferentes espécies fúngicas utilizadas nas duas investigações; foi utilizada nessa investigação uma mistura de curcumina comercial com o meio de cultura *Yeast Peptone Dextrose* (YEPD). Já no presente estudo foi

utilizada uma cepa de *C. albicans* resistente a fluconazol e a curcumina com $\geq 65\%$ de pureza. Além disso, esses autores utilizaram cepas mutantes com superexpressando dos transportadores de efluxo específicos (Cdr1p e Cdr2p de transportadores ABC e Mdr1p de transportadores MFS). Na presente investigação, o mecanismo exato de resistência de *C. albicans* não foi investigado. Portanto, a curcumina pode ter aumentado a suscetibilidade fúngica ao fluconazol por outro mecanismo além da inibição da bomba de efluxo. Por outro lado, um estudo realizado Garcia-Gomes et al.⁵² concorda com os resultados da presente investigação, em que a combinação da curcumina 11 μM com fluconazol 4 mg/L ou 4 $\mu\text{m/mL}$ restaurou a sensibilidade ao fluconazol da cepa resistente e inibiu em 80% o crescimento dessa cepa, mostrando assim uma ação sinérgica dessas duas drogas.

Ainda neste estudo, a combinação de ambos os inibidores do sistema de efluxo (verapamil e curcumina) não potencializou o efeito inibitório do fluconazol, uma vez que o valor de redução para CaR obtido com a associação de verapamil e fluconazol (4,08 $\log_{10}$) foi maior do que a observada para verapamil com curcumina e fluconazol (2,86 $\log_{10}$). Esse resultado não pôde ser comparado com os de outros estudos, uma vez que não foi encontrada uma associação de inibidores de efluxo em outras investigações. Adicionalmente, uma cepa susceptível ao fluconazol também foi avaliada neste estudo como controle. A associação de inibidores da bomba de efluxo (verapamil e curcumina) com o fluconazol teve um efeito mais evidente (maior redução) na cepa resistente ao fluconazol do que o observado na cepa susceptível. Esse resultado já era esperado, uma vez que a cepa susceptível não apresenta superexpressão dos sistemas de efluxo, que são o substrato para os inibidores. Entretanto, a superexpressão do sistema de efluxo das cepas utilizadas nesta investigação não foi avaliada, o que poderia explicar melhor os resultados de susceptibilidade.

7.CONCLUSÕES

- A aPDT mediada pela curcumina e luz LED foi efetiva para redução da viabilidade de ambas cepas de *C. albicans*, as quais mostraram valores de redução em $\log_{10}$ similares. Para CaS, a curcumina sozinha também promoveu redução de viabilidade, o que não foi observado para CaR;
- Em culturas planctônicas, os inibidores das bombas de efluxo (verapamil e curcumina), em concentrações sub-inibitórias, aumentaram a susceptibilidade de ambas as cepas ao fluconazol. Esse efeito sinérgico foi maior para CaR para ambas combinações, ou seja, houve reversão da resistência ao fluconazol, sendo que o verapamil foi mais efetivo do que a curcumina. A associação concomitante dos dois inibidores (verapamil e curcumina) com o fluconazol não promoveu maior redução das cepas utilizadas.

REFERÊNCIAS*

1. Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. Candida species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. J Med Microbiol. 2013; 62(Pt 1):10-24.
2. Rautemaa R, Ramage G. Oral candidosis-clinical challenges of a biofilm disease. Crit Rev Microbiol. 2011; 37(4):328-36.
3. Shapiro RS, Robbins N, Cowen LE. Regulatory circuitry governing fungal development, drug resistance, and disease. Microbiol Mol Biol Rev. 2011; 75(2): 213-67.
4. Patuwo C, Young K, Pardi V, Murata RM. The changing role of HIV-associated oral candidiasis in the era of HAART. J Calif Dent Assoc. 2015; 43(2):87-92.
5. Palmer GD, Robinson PG, Challacombe SJ, Birnbaum W, Croser D, Erridge PL. Aetiological factors for oral manifestations of HIV. Oral Dis. 1996; 2(3):193-7.
6. Costa SF, Marinho I, Araújo EAP, Manrique AEI, Medeiros EAS, Levin AS. Nosocomial fungaemia: a 2-year prospective study. J Hosp Infect. 2000; 45(1):69-72.
7. Dimopoulos G, Karabinis A, Samonis G, Falagas M.E. Candidemia in immunocompromised and immunocompetent critically ill patients: a prospective comparative study. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007; 26(6):377-84.
8. Roca I, Akova M, Baquero F, Carlet J, Cavaleri M, Coenen S, Cohen J, et al. The global threat of antimicrobial resistance: Science for intervention. New Microbes New Infect. 2015; 6(1): 22-9.
9. Muzyka BC, Glick M. A review of oral fungal infections and appropriate therapy. J Am Dent Assoc 1995; 126(1): 63-72.

* De acordo com o Guia de Trabalhos Acadêmicos da FOAr, adaptado das Normas Vancouver. Disponível no site da Biblioteca: <http://www.foar.unesp.br/Home/Biblioteca/guia-de-normalizacao-atualizado.pdf>

10. Vergani CE, Sanitá PV, Mima EG, Pavarina AC, Machado AL. Oral candidiasis: conventional and alternative treatment options. In: Contreras F, Fluentes P. *Candidiasis: epidemiology, symptoms and treatment options*. UK: Nova Biomedical; 2013.
11. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN, Odds FC, Rex JH. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2010; 9(9): 719-27.
12. Scully CM, Kabir EL, Samaranayake LP. *Candida* and oral candidosis: a review. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1994; 5(2): 125-57.
13. White TC, Marr KA, Bowden RA. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(2): 382-402.
14. Clinical and Laboratory Institute Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: approved standard. 3rd ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Institute; 2008.
15. Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, et al. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology*. 2007;153 (10): 3211- 7.
16. Poole K. Efflux-mediated antimicrobial resistance. *J Antimicrob Chemother*. 2005; 56(1): 20- 51.
17. Pao SS, Paulsen IT, Saier MH Jr. Major facilitator superfamily. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998; 62(1): 1- 34.
18. Prasad R, Gaur M, Komath SS. Efflux pumps in drug resistance of *Candida*. *Infect Disord Drug Targets*. 2006; 6(2): 69- 83.
19. Gaur M, Choudhury D, and Prasad R. Complete inventory of ABC proteins in human pathogenic yeast, *Candida albicans*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2005; 9(1): 3- 15.
20. Gaur M, Puri N, Manoharlal R, Rai V, Mukhopadhyay G, Choudhury D, et al. MFS transportome of the human pathogenic yeast *Candida albicans*. *BMC Genomics*. 2008; 9:579.
21. Sanglard D, Odds FC. Reviews resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *Lancet Infect Dis*. 2002; 2(2): 73-85.

22. Gonzales FP, Maisch T. Photodynamic inactivation of microorganisms as an innovative approach to kill mucocutaneous and skin microorganisms. *G Ital Dermatol Venereol.* 2010; 145(4): 477-89.
23. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral Biofilms. *Periodontol 2000.* 2011; 55(1): 143- 66.
24. Donnelly RF, McCarron PA, Tunney MM. Antifungal photodynamic therapy. *Microbiol Res.* 2008; 163(1): 1-12.
25. Jori G, Fabris C, Soncin M, Ferro S, Coppelotti O, Dei D, et al. Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: basic principles and perspective applications. *Lasers Surg Med.* 2006; 38(5): 468-81.
26. Konopka K, Goslinsk T. Photodynamic therapy in dentistry. *J Dent Res.* 2007; 86(8): 694-707.
27. Mantareva V, Angelov I, Kussovski V, Dimitrov R, Lapok L, Wihrl D. Photodynamic efficacy of water-soluble Si(IV) and Ge(IV) phthalocyanines towards *Candida albicans* planktonic and biofilm cultures. *Eur J Med Chem.* 2011; 46(9): 4430- 40.
28. Strakhovskaya MG, Belenikina NS, Ivanova EV, Chemeris YuK, Stranadko EF. The photodynamic inactivation of the yeast *Candida guilliermondii* in the presence of photodithazine. *Mikrobiologiya.* 2002; 71(3): 298- 301.
29. Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro AP, Brunetti IL, Costa CA, Jacomassi DP, et al. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol.* 2011; 87(4): 895-903.
30. Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, MacHado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med.* 2011; 43(9): 927- 34.
31. Martins CV, Da Silva DL, Neres ATM, Magalhães TFF, Watanabe GA, Modolo LV, et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother.* 2009; 63(2): 337- 9.
32. Kishen A, Upadya M, Tegos GP, Hamblin MR. Efflux pump inhibitor potentiates antimicrobial photodynamic inactivation of *Enterococcus Faecalis* biofilm. *Photochem Photobiol.* 2010; 86(6): 1343- 9.
33. Pina V, Rodrigues AG, Costa de Oliveira S, Ricardo E, Mårdh PE. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade

- of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 56(4): 678- 85.
34. Prates RA, Kato IT, Ribeiro MS, Tegos GP, Hamblin M.R. Influence of multidrug efflux systems on methylene blue-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother.* 2011;66(7): 1525- 32.
 35. Sharma M, Manoharlal R, Shukla S, Puri N, Prasad T, Ambudkar S. Curcumin modulates efflux mediated by yeast ABC multidrug transporters and is synergistic with antifungals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009; 53(8): 3256-65.
 36. Yu Q, Ding X, Xu N, Cheng X, Qian K, Zhang B, et al. In vitro activity of verapamil alone and in combination with fluconazole or tunicamycin against *Candida albicans* biofilms. *Int J Antimicrob Agents.* 2013; 41(2): 179- 82.
 37. Rircardo E, De Oliveira SC, Dias AS, Guerra J, Rodrigues AG, Pina C. Ibuprofen reverts antifungal resistance on *Candida albicans* showing overexpression of CDR genes. *FEMS Yeast Res.* 2009; 9(4): 618- 25.
 38. Sharma M, Prasad R. The quorum-sensing molecule farnesol is a modulator of drug efflux mediated by ABC multidrug transporters and synergizes with drugs in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2011; 55(10): 4834- 43.
 39. Ahmad A, Khan A, Manzoor N. Reversal of efflux mediated antifungal resistance underlies synergistic activity of two monoterpenes with fluconazole. *Eur J Pharm Sci.* 2013; 48(1-2): 80-6.
 40. Egner R, Bauer BE, Kuchler K. The transmembrane domain 10 of the yeast Pdr5p ABC antifungal efflux pump determines both substrate specificity and inhibitor susceptibility. *Mol Microbiol.* 2000; 35(5): 1255- 63.
 41. Tanabe K, Lamping E, Adachi K, Takano Y, Kawabata K, Shizuri Y, et al. Inhibition of fungal ABC transporters by unnarmicin A and unnarmicin C, novel cyclic peptides from marine bacterium. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007; 364(4): 990- 5.
 42. Łacka I, Konieczny MT, Bułakowska A, Kodedová M, Gašková D, Maurya IK, et al. Chemosensitization of multidrug resistant *Candida albicans* by the oxathiolone fused chalcone derivatives. *Front Microbiol.* 2015; 6(8): 1- 10.
 43. Shukla S, Zuben ES, Prasad R, Ambudkar SV. Disulfiram is a potent modulator of multidrug transporter Cdr1p of *Candida albicans*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 322(2): 520- 5.

44. Lamping E, Ranchod A, Nakamura K, Tyndall J, Niimi K, Holmes AR, et al. Abc1p is a multidrug efflux transporter that tips the balance in favor of innate azole resistance in *Candida krusei*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(2): 354-69
45. Kaplan NM. Calcium entry blockers in the treatment of hypertension. current status and future prospects. *JAMA*. 1989; 262(6): 817- 23.
46. Brogden RN, Benfield P. Verapamil: a review of its pharmacological properties and therapeutic use in coronary artery disease. *Drugs*. 1996; 51(5): 792- 819.
47. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*. 1999; 284(5418): 1318- 22.
48. Chandra J, Mukherjee PK, Leidich SD, Faddoul FF, Hoyer LL, Douglas LJ. Antifungal resistance of candidal biofilms formed on denture acrylic in vitro. *J Dent Res*. 2001; 80(3): 903- 8.
49. Kaplan JB. Biofilm dispersal: mechanisms, clinical implications, and potential therapeutic uses. *J Dent Res*. 2010; 89(3):205-18.
50. Kucharíková S, Tournu H, Lagrou K, Dijck P, Bujdáková B. Detailed comparison of *Candida albicans* and *Candida glabrata* biofilms under different conditions and their susceptibility to caspofungin and anidulafungin. *J Med Microbiol*. 2011; 60(9): 1261-9.
51. Murjerker, Pranab K, Chandra J, Kuhn D, Ghannoum M. Mechanism of fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. *Infect Immun*. 2003; 71(8): 4333- 40.
52. Garcia-Gomes AS, Curvelo JAR, Soares RMA, Ferreira-Pereira A. Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of *Candida albicans* showing a MDR phenotype. *Med Mycol*. 2012; 50(1): 26- 32.
53. Yu Qilin, Chenpeng Xiao, Kailun Zhang, Chang Jia, Xiaohui Ding, Bing Zhang, et al. The calcium channel blocker verapamil inhibits oxidative stress response in *Candida albicans*. *Mycopathologia*. 2014; 177(3–4): 167- 77.
54. Yu Qilin, Ding X, Zhang B, Xu N, Jia C, Mao J, et al. Inhibitory effect of verapamil on *Candida albicans* hyphal development, adhesion and gastrointestinal colonization. *FEMS Yeast Res*. 2014; 14(4): 633- 41.
55. Reis de Sá LF, Toledo FT, Gonçalves AC, Sousa BA, dos Santos AA, Duarte da Silva VA, Tassis AC, Ramos JA, Carvalho MA, Lamping E, Ferreira-Pereira A.

- Synthetic organotellurium compounds sensitize drug resistant *Candida albicans* clinical isolates to fluconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2016; 61(1): 1231-16.
56. Nazik H, Choudhary V, Stevens DA. Verapamil inhibits aspergillus biofilm, but antagonizes voriconazole. *J Fungi*. 2017; 3(3): 50.
 57. Tran-Nguyen, Prasad R, Falson P, Boumendjel A. Modulators of the efflux pump CDR1P of *Candida albicans*: mechanisms of action and chemical features. *Curr Med Chem*. 2017; 24(30): 3242-53.
 58. Mima EG, Pavarina AC, Silva M, Ribeirão DG, Vergani CE, Kurachi C, et al. Denture stomatitis treated with photodynamic therapy: five cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; 112(5): 602-8.
 59. Soukos NS, Goodson JM. Photodynamic therapy in the control of oral biofilms. *Periodontol 2000*. 2011; 55(1):143-66.
 - 60.** Andrade MC, Carvalho M, Ribeiro D, Dovigo LN, Brunetti I, Giampaolo ET, et al. Effect of different pre-irradiation times on curcumin-mediated photodynamic therapy against planktonic cultures and biofilms of *Candida Spp*. *Arch Oral Biol*. 2013; 58(2): 200- 10.

APÊNDICES

APÊNDICE A – OUTPUT SPSS

Resultados da ANOVA/Welch para CaS e CaR demonstraram diferenças significativas entre os grupos.

Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT)

Figura A1 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA com correção de Welch para cepas susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol submetidas à aPDT mediada por curcumina a 40 μM e luz LED a 5,28 J/cm².

A ANOVA logUFC					
	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	168,419	3	56,140	17,498	,000
Dentro de grupos	111,528	21,867	2,535		
Total	279,947	47			

B ANOVA logUFC					
	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	180,674	3	60,225	34,311	,000
Dentro de grupos	26,661	22,658	,606		
Total	207,335	47			

Fonte: Elaboração do autor

CIM e CFM de Fluconazol, Verapamil e Curcumina

Figura A2 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA com correção de Welch para cepas susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol submetidos a diferentes diluições de fluconazol.

A ANOVA logUFC					
	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	53,815	5	10,763	75,735	,000
Dentro de grupos	8,822	48	,142		
Total	60,637	53			

B ANOVA logUFC					
	Soma dos quadrados	Df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	102,373	5	20,475	46,813	,000
Dentro de grupos	27,166	66	1,007		
Total	168,839	71			

Fonte: Elaboração do autor

Figura A3 - Output dos resultados de testes paramétricos teste paramétrico t de Student, ANOVA com correção de Welch e *post-hoc* de Games-Howell para cepas susceptível (A) e teste não paramétrico de Mann-Whitney para resistente (B) ao fluconazol submetidos a diferentes diluições de curcumina.

A		ANOVA		logUFC	
	Soma dos quadrados	Df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	317,417	3	105,806	6,862	,000
Dentro de grupos	21,507	48	,333		
Total	333,381	51			

B		Mann-Whitney								
		F	Sig.	t	gl	Sig (bilateral)	Diferença de medias	Diferença de erro padrão	Inferior	Superior
	Não se assume variâncias iguais			27,219	17,336	,000	4,08083	,14993	3,76498	4,39668

Teste de amostras independentes, 95% intervalo de confiança.

Fonte: Elaboração do autor

Figura A4 - Output dos resultados de testes paramétricos ANOVA com correção de Welch e *post-hoc* de Games-Howell para cepas susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol submetidos a concentrações de verapamil.

A	ANOVA	logUFC			
	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	137,104	2	68,552	66,948	,000
Dentro de grupos	21,06	36	,529		
Total	156,158	38			

B	ANOVA	logUFC			
	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	14,108	2	7,054	35,981	,000
Dentro de grupos	6,469	33	,196		
Total	20,577	35			

Fonte: Elaboração do autor

Figura A5 - Output dos resultados de testes paramétricos T de Student, ANOVA com correção de Welch e *post-hoc* de Games-Howell para cepas susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol submetidos na associação sub-CIM de verapamil + fluconazol

A	ANOVA	logUFC			
	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	2,707	2	1,354	87,043	,000
Dentro de grupos	,513	33	,016		
Total	3,220	35			

B	Teste t	F	Sig.	t	gl	Sig (bilateral)	Diferença de medias	Diferença de erro padrão	Inferior	Superior
Não se assume variâncias iguais				27,219	17,336	,000	4,08083	,14993	3,76498	4,39668

Teste de amostras independentes, 95% intervalo de confiança.

Fonte: Elaboração do autor

Figura A6 - Output dos resultados de testes paramétricos t de Student, ANOVA com correção de Welch e *post-hoc* de Games-Howell para cepas susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol submetidos na associação sub-CIM de curcumina + fluconazol.

A	ANOVA	logUFC			
	Soma dos quadrados	df	Quadrado médio	F	Sig.
Entre grupos	17,528	2	8,764	64,479	,000
Dentro de grupos	19,914	33	1,121		
Total	21,533	35			

B		Teste t								
		F	Sig.	T	Gl	Sig (bilateral)	Diferença de medias	Diferença de erro padrão	Inferior	Superior
	Não se assume variâncias iguais			21,906	13,194	,000	2,28000	,10408	2,05548	2,50452

Teste de amostras independentes, 95% intervalo de confiança.

Fonte: Elaboração do autor

Figura A7 - Output dos resultados de testes paramétricos Resultados teste paramétrico t de Student, para cepas susceptível (A) e resistente (B) ao fluconazol submetidos na associação de verapamil + curcumina + fluconazol

A Teste t

		F	Sig.	T	gl	Sig (bilateral)	Diferença de medias	Diferença de erro padrão	Inferior	Superior
	Não se assume variâncias iguais			6,943	19,291	,000	,82667	,11907	,57770	1,07563

B Teste t

		F	Sig.	t	gl	Sig (bilateral)	Diferença de médias	Diferença de erro padrão	Inferior	Superior
	Não se assume variâncias iguais			10,212	13,250	,000	2,85667	,27973	2,25351	3,45982

Teste de amostras independentes, 95% intervalo de confiança.

Fonte: Elaboração do autor

Não autorizo a reprodução deste trabalho até 6 de Agosto de 2021

(Direitos de publicação reservado ao autor)

Araraquara 6 de Agosto de 2018

Yuliana Del Pilar Vega Chacón