



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

PRISCILA DOS SANTOS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CLORIDRATO DE
VERAPAMIL FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA***

2018

PRISCILA DOS SANTOS OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO CLORIDRATO DE
VERAPAMIL FRENTE A LEVEDURAS DO GÊNERO *CANDIDA***

Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, para obtenção do título de MESTRE em Mestrado Profissional do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIA E TECNOLOGIA APLICADA À ODONTOLOGIA. Área de Inovação Tecnológica Multidisciplinar com ênfase em Odontologia. Linha de pesquisa: Inovação Tecnológica.

Orientador: Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim

Coorientadora: Profa. Dra. Liliana Scorzoni

São José dos Campos

2018

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2018]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Oliveira, Priscila dos Santos

Avaliação da atividade antifúngica do Cloridrato de Verapamil frente a leveduras do gênero *Candida* / Priscila dos Santos Oliveira. - São José dos Campos : [s.n.], 2018.
40 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Aplicada à Odontologia - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2018.

Orientador: José Benedito Oliveira Amorim

Coorientador: Liliana Scorzoni

1. Cloridrato de Verapamil. 2. *Candida* spp. 3. Atividade antifúngica. I. Amorim, José Benedito Oliveira, orient. II. Scorzoni, Liliana, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. José Benedito Oliveira Amorim (Orientador)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Mônica Fernandes Gomes

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Adj. Dayane Batista Tada

Universidade Federal de São Paulo (Unifesp)

Engenharia e Ciências de Materiais

Campus de São José dos Campos

São José dos Campos, 06 de agosto de 2018.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família!

A minha mãe Dalva, ao meu pai Hélio, as minhas irmãs Marcela e Ana Paula, ao meu sobrinho Vitor, e ao meu filho Lucas.

Não tenho como agradecer por toda ajuda e incentivo nos momentos difíceis!

Eu não conseguiria vencer mais essa etapa sem vocês ao meu lado...

Amor sem limites!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos!

Ao meu querido orientador, Prof. Amorim, pelo exemplo de dedicação e cordialidade. Muito obrigada por confiar em meu trabalho e pelas oportunidades de crescimento profissional e pessoal! Sem os seus ensinamentos, eu não teria conseguido!

À minha querida coorientadora, Profa. Liliana, meu profundo agradecimento pela paciência e incentivo que recebi durante toda a trajetória! Sem a sua experiência e dedicação nada disso seria possível!

À Profa. Adj. Luciane Dias de Oliveira, por me conceder a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e aprender junto com a sua equipe!

Aos meus colegas da turma Mestrado Profissional UNESP 2016, por toda força e amizade que tivemos durante o tempo em que passamos juntos.

*“Não tenha medo da mudança: coisas boas se vão
para que melhores possam vir!”*

(Biaah Soares)

*“A vida me ensinou que chorar alivia,
mas sorrir torna tudo mais bonito!”*

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

RESUMO	8
ABSTRACT	9
1 INTRODUÇÃO	10
2 PROPOSIÇÃO	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Fármaco Cloridrato de Verapamil	18
3.2 Fase experimental – micro-organismos e condições de cultivo	18
3.2.1 Avaliação da atividade antifúngica	18
3.2.1.1 Concentração inibitória mínima (CIM)	19
3.2.1.2 Concentração fungicida mínima (CFM)	20
3.2.2 Formação do biofilme de <i>Candida</i> spp	20
3.2.2.1 Quantificação da biomassa total tratado por cristal violeta	20
3.3 Cultura celular e condições de cultivo	21
3.3.1 Viabilidade celular (citotoxicidade <i>in vitro</i>)	22
3.3.1.1 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade <i>in vitro</i>) por meio da reação de redução da resazurina	22
4 RESULTADO	24
4.1 Avaliação da atividade antifúngica para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	24
4.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	26
4.3 Avaliação da redução de biomassa em biofilme de <i>Candida</i> spp. após tratamento com Cloridrato de Verapamil	27
4.4 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade <i>in vitro</i>) por meio da reação de redução da resazurina	29
5 DISCUSSÃO	31
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BFs	Bifosfonatos
°C	Grau Celsius
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i>
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
HaCaT	Queratinócitos Humanos
HEPES	<i>HydroxyEthyl Piperazine Ethane Sulfonic Acid</i>
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
LPL	Lipoproteínas de Baixa Densidade
MDR	<i>Multi-Drug Resistance</i>
mL	Mililitro
MOPS	<i>Morpholino Propanesulfonic Acid</i>
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sódio
nm	Nanômetro
NICUs	Unidades de Cuidados Intensivos Neonatais
PAEs	<i>Post-Antibiotic Effect</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> Tampão Fosfato Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
UFC	Unidade Formadora de Colônia
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar

Oliveira PS. Avaliação da atividade antifúngica do Cloridrato de Verapamil frente a leveduras do gênero *Candida*. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2018.

RESUMO

Resumo: A epidemiologia das infecções causadas por *Candida* sofreu mudanças nos últimos anos. Embora *Candida albicans* ainda seja o principal patógeno causador de candidíase, relatos recentes reportam o aumento da incidência de infecções causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*. A toxicidade dos fármacos antifúngicos utilizados juntamente com o desenvolvimento da resistência tem se tornado um sério problema clínico. Com isso, atualmente existe a urgência na descoberta de novos compostos com atividades antifúngicas. **Objetivos:** avaliar a atividade antifúngica do fármaco Cloridrato de Verapamil, determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM), frente à *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 e *Candida glabrata* ATCC 9030. Além de avaliar a citotoxicidade do fármaco em queratinócitos humanos (HaCaT). **Metodologia:** a determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição de acordo com *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). A CFM foi determinada por plaqueamento em ágar Sabouraud de alíquotas provenientes das diluições do ensaio de microdiluição. A avaliação da citotoxicidade foi realizada pela técnica de redução da resazurina, sendo possível avaliar a atividade mitocondrial das células HaCaT. **Resultados:** o fármaco Cloridrato de Verapamil demonstrou atividade antifúngica contra as quatro espécies patogênicas de *Candida*, com o valor de CIM de 1250 μ M; valor de CFM maior que 1250 μ M, sendo assim este fármaco foi considerado fungistático. Além disso, o Cloridrato de Verapamil não apresentou citotoxicidade nas concentrações avaliadas no estudo, pois, a redução de células viáveis nas concentrações mais elevadas não ultrapassa 30%. Com relação à redução de biomassa em biofilme de *Candida*, após tratamento com Cloridrato de Verapamil, houve redução (de 10 a 20%) para as quatro espécies de *Candida* em estudo, quando utilizadas concentrações de fármaco correspondentes a CIM; quando utilizadas concentrações de fármaco correspondentes a cinco vezes o valor de CIM, houve um aumento significativo na redução de biomassa (de 25% a 60%) em biofilme formado pelas quatro espécies de *Candida*. **Conclusão:** o fármaco Cloridrato de Verapamil apresentou atividade antifúngica para *Candida albicans* e *Candida* não-*albicans*, sendo considerado um fármaco fungistático, além de não apresentar citotoxicidade em queratinócitos humanos, e demonstrar atividade na redução de biomassa em biofilme formado pelas quatro espécies de *Candida*. Demais estudos são necessários para verificar a ação desse fármaco em diferentes mecanismos de virulência frente a células de *Candida* spp.

Palavras-chave: Cloridrato de Verapamil. *Candida* spp. Atividade antifúngica.

Oliveira PS. Evaluation of the antifungal activity of Verapamil Hydrochloride against yeasts of the genus *Candida*. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2018.

ABSTRACT

Abstract: The epidemiology of *Candida* infections has changed in recent years. Although *Candida albicans* is still the main pathogen causing candidiasis, recent reports have reported an increase in the incidence of infections caused by non-*albicans Candida* species. The toxicity of the antifungal drugs used together with the development of resistance has become a serious clinical problem. With this, there is now an urgency in the discovery of new compounds with antifungal activities. **Objectives:** To evaluate the antifungal activity of the drug Verapamil Hydrochloride, to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicidal Concentration (CFM) against *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 and *Candida glabrata* ATCC 9030. In addition to evaluating the cytotoxicity of the drug in human keratinocytes (HaCaT). **Methodology:** MIC determination was performed by the microdilution technique according to The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). The CFM was determined by plating on Sabouraud agar from aliquots from the dilutions of the microdilution assay. The evaluation of cytotoxicity was performed using the resazurin reduction technique, and it was possible to evaluate the mitochondrial activity of HaCaT cells. **Results:** The drug Verapamil Hydrochloride demonstrated antifungal activity against the four pathogenic species of *Candida*, with MIC value of 1250 μ M; CFM value greater than 1250 μ M, so this drug was considered fungistatic. In addition, Verapamil Hydrochloride did not present cytotoxicity in the units evaluated in the study, because the reduction of viable cells in the most cells is not exceeded by 30%. Regarding the biomass reduction in *Candida* biofilm, after treatment with Verapamil Hydrochloride, there was a reduction (from 10 to 20%) for the four *Candida* species in study, when the use of drug corresponding to MIC; when the use of drug corresponding to 5 times of MIC, there was a significant increase in the biomass reduction (from 25% to 60%) in the biofilm molded by the four *Candida* species. **Conclusion:** Thus, the drug Verapamil Hydrochloride led to the antifungal activity of *Candida albicans* and non-*albicans Candida* species, being considered a fungicidal drug, besides not presenting cytotoxicity in human serotonizers, and were submitted to biomass reduction in biofilm molded by four *Candida* species. More studies are needed to verify the action of the drug on different mechanisms of virulence against *Candida* spp cells.

Keywords: Verapamil Hydrochloride. *Candida* spp. Antifungal activity.

1 INTRODUÇÃO

A partir de 1980 tem se observado aumento na incidência das infecções causadas por fungos, particularmente entre indivíduos imunocomprometidos e hospitalizados em condições graves, como por exemplo, os que fazem uso de quimioterapia, hemodiálise, nutrição parenteral e cateteres ou transplantados (Mikulska et al., 2012).

O gênero *Candida* destaca-se como patógeno fúngico oportunista. Este gênero inclui cerca de 200 espécies diferentes, mas, apenas algumas delas são agentes patógenos humanos e causam infecções quando o hospedeiro se torna debilitado ou imunocomprometido. As infecções por *Candida* podem ser superficiais ou invasivas. As infecções superficiais afetam a pele ou as mucosas e, podem ser tratadas com sucesso, com os agentes antifúngicos tópicos (Yu et al., 2014).

Por outro lado, a candidíase invasiva ocorre, principalmente, devido a fatores predisponentes, como cirurgias (especialmente na região abdominal), queimaduras, permanência prolongada em unidade de terapia intensiva (UTI), administração prévia de antibióticos de amplo espectro, e pacientes imunocomprometidos (Pfaller, Diekema, 2004).

Candida albicans é um dos principais patógenos humanos oportunista (Kabir, Hussain, 2009). Esta espécie vive de forma comensal nos tratos oral, gastrointestinal e geniturinário (Jackson et al., 2007). As infecções superficiais por *C. albicans* afetam a pele ou mucosas, no entanto, se o hospedeiro está debilitado ou imunocomprometido, as infecções podem invadir a corrente sanguínea e disseminar-se para os órgãos internos (López-Martínez, 2010).

A morfogênese de *Candida albicans* e a colonização gastrointestinal estão intimamente associadas à patogenicidade desse micro-organismo (Yu et al., 2014). Até recentemente, pouco se sabia sobre os mecanismos pelos quais as mucosas propícias à colonização de *C. albicans* reagem quando as hifas tentavam invadir o tecido. As propriedades das células de leveduras, a interação com o hospedeiro e os mecanismos imunológicos que reconhecem e diferenciam a levedura versus a invasão de *C. albicans* são descritas (Wachtler et al., 2011).

Vários estudos afirmam que as infecções fúngicas orais são originadas,

principalmente por *C. albicans*, cujas leveduras estão presentes na flora normal da cavidade oral (Coronado-Castellote, Jiménez-Soriano, 2013; Dabas, 2013; Javed et al., 2014; Singh et al., 2014), embora sejam encontradas também outras espécies, como a *C. glabrata* e *C. tropicalis* (Fu et al., 2016).

Quando existe um desequilíbrio entre o hospedeiro e o fungo, ocorre uma situação de parasitismo originando, assim, a candidíase oral (Carlo et al., 2015). A candidíase oral é caracterizada por placas removíveis que surgem na cavidade oral, primeiramente afetando a boca e, em um estágio mais avançado, a orofaringe e o esôfago do hospedeiro. Uma das alternativas de profilaxia é a utilização de enxaguatórios bucais, constituídos por ingredientes químicos que previnem a proliferação de agentes patogênicos (Bugno et al., 2006).

Além da *Candida albicans*, existem outras espécies com capacidade de causar infecções, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida krusei* (MacCallum, 2012; Giolo, Svidzinski, 2010). As cinco espécies mencionadas causam mais de 90% das infecções invasivas, embora a prevalência de cada espécie dependa da localização geográfica, da população e das manifestações clínicas (Miceli et al., 2011). Mundialmente, tem-se observado o aumento acentuado nas infecções sanguíneas, devido às espécies não *albicans* como *C. glabrata*, nos Estados Unidos e *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* na Europa, Canadá e América Latina (Almirante et al., 2006).

Candida glabrata é considerada um saprófito da flora normal de indivíduos saudáveis e, que raramente causa infecção grave em humanos. No entanto, após o uso generalizado e aumentado da terapia imunossupressora juntamente com a terapia antifúngica de amplo espectro, a frequência de infecções das mucosas e infecções sistêmicas causadas por *C. glabrata* aumentou de forma significativa (Hitchcock et al., 1993). Conforme o local de infecção, *C. glabrata* é frequentemente a segunda causa mais comum de candidíase após *C. albicans*.

As infecções causadas por *C. glabrata* podem ser de mucosas ou sistêmicas, e são comuns em pessoas imunocomprometidas ou com diabetes *mellitus* (Geiger et al., 1995). Em contraste com outras espécies de *Candida*, *C. glabrata* não é considerada um fungo dimórfico. As infecções por *C. glabrata* são difíceis de tratar e, muitas vezes, resistentes a vários agentes antifúngicos da classe dos azóis, especialmente o fluconazol. Consequentemente, as infecções causadas

por *C. glabrata* têm alta taxa de mortalidade em pacientes hospitalizados comprometidos (Geiger et al., 1995).

Ao longo da última década, a incidência de *Candida parapsilosis* aumentou de maneira drástica (Almirante et al., 2006). Os relatos indicam que *C. parapsilosis* é a segunda espécie de *Candida* mais comumente isolada de hemoculturas e, ainda ultrapassa *Candida albicans* em alguns hospitais europeus, asiáticos e sul-americanos (Brito et al., 2006).

Partindo deste ponto, os pesquisadores associaram a infecção com a introdução exógena de *C. parapsilosis*, o que certamente sugeriu a ligação de *C. parapsilosis* com a instrumentação médica invasiva (Weems Jr, 1992). Ao contrário de *C. albicans* e *C. tropicalis*, que podem existir em múltiplas formas morfogénéticas, *C. parapsilosis* não forma hifas verdadeiras, existindo tanto em fase de levedura como de pseudo-hifa (Laffey, Butler, 2005).

C. parapsilosis é tipicamente um comensal de pele humana, sendo notória sua capacidade de crescer na nutrição parenteral e formar biofilmes em cateteres e outros dispositivos implantados, para disseminação nosocomial e por persistência no ambiente hospitalar (Chen et al., 2006). Além disso, *C. parapsilosis* é uma preocupação com recém-nascidos críticos, é responsável por mais de um quarto de todas as infecções fúngicas invasivas, no Reino Unido e, até um terço das infecções neonatais de *Candida* na América do Norte (Chen et al., 2006). Recentemente, foi considerada um micro-organismo predominantemente isolado em muitas unidades de cuidados intensivos neonatais (NICUs), e que está associado à sua mortalidade (Clerihew et al., 2007).

Além do desenvolvimento da resistência por *Candida albicans* e *Candida glabrata*, tem sido relatado que o uso frequente de fluconazol pode ser propício ao surgimento de *Candida krusei* como um patógeno oportunista, comumente, isolado em hospitais (Wingard et al., 1991). Esta descoberta é clinicamente significativa porque *C. krusei* pode causar infecções graves em pacientes suscetíveis. Além disso, este organismo, de uma forma geral, está relacionado à resistência ao fluconazol, ambos *in vitro* e *in vivo* (Goldman et al., 1993). *Candida krusei* foi reconhecida como um patógeno fúngico, potencialmente, resistente a multidrogas (MDR), devido à sua resistência ao fluconazol combinada com relatos de susceptibilidade diminuída ao fluconazol e à anfotericina B (Abbas et al., 2000).

O fenótipo MDR exibido por *C. krusei* coloca um dilema terapêutico quando se consideram escolhas de tratamento para pacientes imunocomprometidos, especialmente para aqueles com exposição prévia ao fluconazol (Spellberg et al., 2006; Pemán et al., 2006). Apesar da resistência ao fluconazol pela *C. krusei*, geralmente esta espécie permanece suscetível *in vitro* ao voriconazol, devido à ligação mais efetiva deste medicamento à isoenzima do citocromo P-450 (Pfaller, Diekema, 2007).

Os antifúngicos da classe das equinocandinas, como a caspofungina, foram utilizados com sucesso para tratar várias infecções envolvendo *C. krusei* (Pan et al., 2005). No entanto, houve recentes relatos de falência de pacientes no tratamento de infecções por *C. krusei* utilizando caspofungina, devido ao aumento da resistência adquirida (Pelletier et al., 2005).

Estas descobertas enfatizaram a ambiguidade de *C. krusei* em relação ao desenvolvimento de resistência a uma ampla gama de antifúngicos. Junto com *Candida glabrata*, *C. krusei* deve ser considerada uma espécie importante que precisa ser monitorada para o desenvolvimento da resistência antifúngica (Kahn et al., 2007). Apesar do fenômeno MDR exibido por *C. krusei*, poucos estudos abordaram o perfil epidemiológico e a susceptibilidade antifúngica da *C. krusei*. A maioria das informações disponíveis sobre *C. krusei* provém de instituições individuais (Muñoz et al., 2005).

O tratamento das infecções causadas por *Candida* spp. Limita-se a algumas classes de agentes antifúngicos, como polienos, azoles e equinocandinas, cujos mecanismos de ação estão relacionados com a ligação e síntese de componentes presentes na parede celular e na membrana plasmática. Além disso, a maioria dessas drogas exerce efeitos indesejáveis no hospedeiro, como nefrotoxicidade causada pela anfotericina B, distúrbios visuais causados pelo voriconazol e insuficiência cardíaca congestiva causada pelo itraconazol. Certas drogas, como as equinocandinas têm o uso clínico limitado devido aos altos custos (Li et al., 2015).

Os agentes antifúngicos da classe dos polienos utilizados para o tratamento de doenças humanas são anfotericina B (AmB) e nistatina. Porém, o uso intensivo de antifúngicos tornou estes fungos mais resistentes aos medicamentos, o que se transformou em um problema clínico atualmente. Azoles são considerados a primeira escolha de tratamento na infecção por *Candida*, no entanto, tem-se

observado um aumento nos casos de resistência a esta classe de antifúngicos (Sajjan et al., 2014).

A nistatina é, provavelmente, o fármaco mais conhecido no tratamento das infecções fúngicas superficiais causadas por *Candida* spp, tendo atividade fungicida e fungistática, dependendo da concentração administrada. Não há absorção quando é administrada oralmente, porém é demasiado tóxica para uso parenteral. Esta droga é um antifúngico da classe dos polienos que se liga ao ergosterol presente na membrana plasmática do fungo e aumenta a permeabilidade da membrana por meio da criação de poros, promovendo o vazamento de componentes celulares essenciais conduzindo à morte celular (Jin et al., 2009).

Os bochechos orais com nistatina são relativamente ineficazes devido ao curto tempo de contato com a mucosa oral. As pastilhas de nistatina podem ser consumidas lentamente e, assim, têm um tempo maior de ação. As formulações em pastilhas resultam em melhor aceitação pelo paciente devido à sua retenção prolongada, sendo um melhor agente fungicida do que em suspensão. Contudo, como as pastilhas de nistatina são adocicadas com sacarose, o seu uso vai aumentar o risco de cáries dentárias podendo estar contraindicada em indivíduos propensos à cárie. As pastilhas de nistatina são ideais para o tratamento da estomatite protética associada à *Candida* spp. e para a prevenção de candidíase oral recidiva em pacientes HIV positivos (Jin et al., 2009).

Da mesma maneira que a nistatina, a anfotericina B, também, possui como alvo o ergosterol, que é um elemento estrutural e funcional essencial da membrana plasmática das células fúngicas, similar ao esterol presente nas membranas celulares dos mamíferos, chamado colesterol (Surarit, Shepherd, 1987). A anfotericina B é um fármaco essencial no tratamento de infecções sistêmicas por *Candida* spp, sendo eleito para o tratamento de infecções fúngicas severas. Porém, apresenta efeitos adversos em reações sistêmicas imediatas, caracterizadas por febre, calafrios, hipotensão, toxicidade renal, toxicidade hematológica (Huber, Terézhalmy, 2011).

Além do desenvolvimento de resistência aos antifúngicos, a ocorrência de biofilmes ganha cada vez mais destaque. Estas estruturas, uma vez compostas, atuam como ponto de contaminação constante, liberando células de micro-organismos patogênicos e deteriorantes, podendo comprometer, portanto, a

qualidade microbiológica de matérias-primas, insumos e alimentos processados (Xavier, 2003).

As células aderidas são designadas por sésseis, enquanto aquelas livres e dispersas são denominadas por planctônicas. O biofilme corresponde a uma comunidade de células aderidas a um substrato, inseridas em uma matriz de polímeros extracelulares, na qual existem diferenciados fenótipos, metabolismo, fisiologia e transcrição genética (Xavier, 2003).

As células em biofilme são de 500 até 1000 vezes mais resistentes quando comparadas às células planctônicas. Biofilmes são as únicas estruturas microbianas que admitem a coexistência de organismos aeróbios e anaeróbios estritos a distâncias de poucas centenas de micrômetros um do outro. Uma vez que o biofilme é constituído de agregados de células e a formação de sua estrutura tridimensional é um processo dinâmico que envolve uma série de eventos moleculares coordenados, ele representa um ambiente propício para a comunicação célula-célula, ou *quorum sensing* (QS) (Xavier, 2003).

A candidíase oral é um tipo de patologia caracterizada por placas brancas removíveis que surgem na boca e, em seu estágio mais avançado, na orofaringe e no esôfago do hospedeiro. Uma das alternativas de profilaxia dentária é a utilização de enxaguatórios bucais, constituídos por componentes químicos ativos que previnem a proliferação de agentes patogênicos após a remoção mecânica realizada pela escovação (Bugno et al., 2006).

Além dos problemas relacionados à resistência aos antifúngicos e produção de biofilme existe uma relação filogenética entre as células fúngicas e as células humanas, devido a ambas serem eucarióticas e terem metabolismo semelhante na produção de energia, na síntese de proteínas e na divisão celular. Logo, um número reduzido de alvos de agentes antifúngicos foi identificado (Xavier, 2003). Assim, o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas torna-se essencial tanto para minimizar os efeitos adversos causados ao paciente, bem como para reduzir o aumento da resistência aos agentes antifúngicos tradicionalmente utilizados.

Alguns estudos foram realizados com o intuito de investigar o efeito *in vitro* e *in vivo* da atividade antifúngica demonstrada pelo fármaco Cloridrato de Verapamil. Há recentes relatos de que este fármaco induza uma diminuição significativa no desenvolvimento de hifas de células de *C. albicans*, além de inibir a capacidade de

aderir à superfície bucal e a células epiteliais (Afeltra, Verweij, 2003; Yu et al., 2014; Li et al., 2015; Nazik et al., 2017).

Desta forma, o fármaco de escolha para o desenvolvimento desse estudo foi o Cloridrato de Verapamil, pertencente a classe dos antagonistas dos canais de cálcio, os quais são divididos em três grupos químicos: fenilalquilaminas (Cloridrato de Verapamil), dihidropiridinas (Nifedipina) e benzotiazepinas (Diltiazem) (Rang et al., 2012).

Cloridrato de Verapamil é a substância ativa de um medicamento conhecido comercialmente como Dilacoron, sendo um dos principais medicamentos de escolha para mulheres grávidas com leve a moderada hipertensão, devido ao rápido início de ação, mantendo uma ação prolongada, porém com uma ação hipotensora branda, e efeitos colaterais bem toleráveis ao paciente (Rang et al., 2012).

O mecanismo de ação do Cloridrato de Verapamil consiste em bloquear o influxo de cálcio nas células do músculo cardíaco e do músculo liso vascular, através dos canais do tipo L, dependentes de voltagem (de ação lenta), pelo lado interno da membrana celular. Com isso, haverá uma redução da frequência de abertura desses canais, como consequência, observa-se um relaxamento prolongado do músculo liso vascular, diminuindo a resistência vascular, e um efeito inotrópico negativo no músculo cardíaco, diminuindo a força de contração, e consequentemente diminuindo a frequência cardíaca e a pressão arterial. É também conhecido que esse fármaco não provoca alterações na pressão arterial de indivíduos normotensos (Goodman, 2006).

2 PROPOSIÇÃO

A proposta do presente estudo foi avaliar as atividades antifúngicas do fármaco Cloridrato de Verapamil, frente as espécies *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*, por serem tais espécies consideradas os principais patógenos oportunistas do gênero *Candida*.

Avaliamos também, a citotoxicidade *in vitro* desse fármaco em linhagens celulares de queratinócitos humanos (HaCaT), por meio da análise qualitativa e quantitativa da viabilidade celular usando a técnica de reação de redução da resazurina.

Investigamos ainda, a avaliação de redução de biomassa em biofilme formado pelas quatro espécies de *Candida*, bem como a quantificação da biomassa total tratada por cristal violeta.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármaco Cloridrato de Verapamil

A partir de uma solução mãe do fármaco diluída em salina 0,9%, realizou-se uma diluição seriada de Cloridrato de Verapamil em dez concentrações, distribuídas em placas de microdiluição de 96 poços, sendo: 2,4 μM (1,1 $\mu\text{g/mL}$), 4,8 μM (2,2 $\mu\text{g/mL}$), 9,7 μM (4,4 $\mu\text{g/mL}$), 19 μM (8,9 $\mu\text{g/mL}$), 39 μM (17,8 $\mu\text{g/mL}$), 78 μM (35,5 $\mu\text{g/mL}$), 156 μM (71 $\mu\text{g/mL}$), 312 μM (142 $\mu\text{g/mL}$), 625 μM (284 $\mu\text{g/mL}$), 1250 μM (568 $\mu\text{g/mL}$).

Essas concentrações foram obtidas a partir de estudos prévios utilizando este fármaco.

3.2 Fase experimental – micro-organismos e condições de cultivo

Neste estudo foram utilizadas as seguintes cepas: *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 6258, *Candida parapsilosis* ATCC 90018 e *Candida glabrata* ATCC 9030. As leveduras foram cultivadas em Sabouraud e incubadas a 37°C, com agitação de 150 rpm.

3.2.1 Avaliação da atividade antifúngica

Avaliação da atividade do fármaco Cloridrato de Verapamil na inibição do crescimento fúngico, bem como sua ação fungicida, por meio dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

3.2.1.1 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os testes de sensibilidade foram realizados segundo *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST 7.3.1) – Método para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) com diluição em meio de cultura de agentes antifúngicos.

O meio de cultura utilizado foi RPMI 1640 (com L-glutamina e indicador de pH, sem bicarbonato) suplementado com glicose a uma concentração final de 2% (RPMI 2% G), ajustado para pH 7,0.

A concentração da suspensão fúngica foi padronizada em câmara de Neubauer de $0,5 \times 10^5$ – $2,5 \times 10^5$ UFC/mL para cada espécie de *Candida* utilizada no experimento.

Em placas de microdiluição de 96 poços, a cada três poços, foram adicionadas as dez concentrações do fármaco diluídas em meio de cultura (RPMI). Posteriormente, estas placas foram mantidas em estufa por 24 horas.

Como controle do experimento, a anfotericina B foi utilizada por se tratar de uma droga padrão, cujos valores de CIM estão descritos na literatura, com o intuito de verificar o crescimento adequado das leveduras, bem como a eficácia do teste.

Esta droga foi então diluída em meio de cultura (RPMI), nas seguintes concentrações: 0,01 µg/mL, 0,03 µg/mL, 0,06 µg/mL, 0,125 µg/mL, 0,25 µg/mL, 0,5 µg/mL, 1,0 µg/mL, 2,0 µg/mL, 4,0 µg/mL e 8,0 µg/mL.

Como controle negativo (C-) foi utilizado somente meio de cultura (RPMI). Como controle positivo (C+) foram utilizadas as quatro espécies de *Candida* em meio de cultura (RPMI), sem o tratamento com o fármaco.

Para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) observou-se, nas placas de microdiluição, a menor concentração em que houve inibição total do crescimento das leveduras nos poços. Este experimento foi repetido três vezes em dias diferentes (três experimentos independentes).

3.2.1.2 Concentração fungicida mínima (CFM)

Após o tempo de incubação, uma gotícula foi retirada de cada um dos poços da placa de microdiluição, por meio de um palito de madeira e, cuidadosamente foi esfregada em ágar Sabouraud contido em placas grandes, sem que este fosse perfurado. Após 24 horas de incubação a 37°C, verificou-se o crescimento ou não de colônias em suas respectivas concentrações.

3.2.2 Formação de biofilme de *Candida* spp

A formação do biofilme foi baseada em metodologia descrita por Thein et al. (2006). Adicionou-se à microplaca de 96 poços, 100 µL de suspensão padronizada a 10^8 UFC/mL de cada uma das quatro espécies de *Candida* em meio RPMI acrescido de 2% de glicose. As placas foram incubadas a 37°C com agitação de 75 rpm durante 90 minutos para o estágio de pré-adesão.

Após este estágio, os poços foram lavados, três vezes, com tampão de fosfato salino (PBS) para remoção de leveduras não aderentes. Posteriormente, foi adicionado novamente 100 µL de meio aos poços, e incubou-se a placa a 37°C sob agitação. O meio de cultura foi novamente trocado após 24 horas de incubação.

O tratamento foi realizado com biofilmes maduros formados após 48 horas, com a adição de fármaco correspondente a concentração de CIM ($1250 \mu\text{M} = 568 \mu\text{g/mL}$) e a cinco vezes o valor de CIM ($6250 \mu\text{M} = 2840 \mu\text{g/mL}$). Posteriormente, estas placas foram mantidas em estufa por 24 horas. Este experimento foi repetido três vezes em dias diferentes (três experimentos independentes).

3.2.2.1 Quantificação da biomassa total tratado por cristal violeta

Para a quantificação de biomassa em biofilmes, utilizou-se a metodologia

por adição de cristal violeta. Os biofilmes formados pelas quatro espécies de *Candida* (após 48 horas de incubação) foram tratados com o fármaco, lavados com PBS e fixados com etanol absoluto por 15 minutos. O etanol foi, então, removido e o biofilme foi seco em temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas.

Adicionou-se a cada poço, 100 µL de cristal violeta a 0,5%, e após 20 minutos, o excesso do corante foi removido, e os poços contendo biofilme foram lavados com PBS por três vezes. Em seguida, foram adicionados 100 µL de etanol absoluto para diluir o corante.

A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm e os resultados foram expressos em percentual de redução. O controle do experimento foi realizado com biofilmes maduros (após 48h) formados pelas quatro espécies de *Candida* sem o tratamento com o fármaco, cujos valores obtidos de absorbância representam 100% de biomassa. Este experimento foi repetido três vezes em dias diferentes (três experimentos independentes).

3.3 Cultura celular e condições de cultivo

As células HaCaT foram guardadas em nitrogênio líquido até serem utilizadas. Posteriormente, foram descongeladas e cultivadas em um meio de cultura adequado: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) – (Gibco, Grand Island, NY), suplementado com 14,51 µM de NaHCO₃, 15 µM HEPES suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina G e estreptomicina. As culturas foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera de CO₂ a 5%.

As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 25 cm² de superfície até obter uma confluência de 75-90% (monocamada confluenta), a qual foi obtida após um período de dois a três dias. O meio de cultura foi trocado três vezes por semana, e o crescimento das células foi observado por microscopia. Uma vez confluenta, a monocamada foi tratada com tripsina (0,05%), 0,53 µM EDTA e PBS para remoção das células e transferência para novas garrafas.

3.3.1 Viabilidade celular (citotoxicidade *in vitro*)

Segundo a norma ISO 10993-5 (2009), o teste de citotoxicidade *in vitro* pode ser realizado pela avaliação qualitativa e quantitativa da viabilidade celular, através do teste de contato direto com produtos para a saúde, cujos valores inferiores a 70% de viabilidade celular devem ser considerados como citotóxicos.

3.3.1.1 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade *in vitro*) por meio da reação de redução da resazurina

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo método colorimétrico da reação de redução da resazurina, de acordo com Pavan et al. (2010).

Para este ensaio, linhagens celulares HaCaT (queratinócitos humanos), adquiridas pelo Banco de células do Rio de Janeiro (BCRJ), foram semeadas a uma concentração de 10^6 cels/mL, em microplaca de 96 poços, e posteriormente, incubadas por 24 horas a 37°C com 5% CO₂.

Em placas de microdiluição de 96 poços, a cada três poços, foram adicionadas as dez concentrações do fármaco diluídas em meio de cultura (DMEM). Posteriormente, estas placas foram mantidas em estufa por 24 horas.

Após este período, foram adicionados 30 µL de resazurina em cada poço, na concentração de 0,01%, e incubadas por 6 horas. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido) é um corante azul, que é reduzido a resorufina, um corante rosa com alta fluorescência. Esta reação irreversível da resazurina é proporcional à respiração aeróbia, demonstrando a atividade mitocondrial das células. Portanto, essa reação ocorre somente em células viáveis, cuja viabilidade celular também pode ser determinada pela intensidade da coloração rosa.

O controle negativo (C-) do experimento foi realizado com células HaCat em meio de cultura (DMEM), com adição de resazurina, sem o tratamento com o fármaco. O controle positivo (C+) foi realizado com células HaCat, diluído em um solvente orgânico (DMSO 30%), com adição de resazurina, cujo intuito foi verificar o

controle de morte das células.

A absorbância de todos os poços foi lida em um espectrofotômetro ajustado a 570 nm, cujas densidades ópticas (DO) obtidas foram convertidas em percentual de viabilidade celular, empregando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ Viabilidade} = (\text{DO Grupo Tratado} \times 100) / \text{Média DO Grupo Controle}$$

Onde:

DO Grupo Tratado = densidade óptica obtida das leituras dos poços que receberam tratamento com o fármaco;

DO Grupo Controle = densidade óptica obtida das leituras dos poços que não receberam tratamento com o fármaco, considerando estes valores como 100% de viabilidade celular.

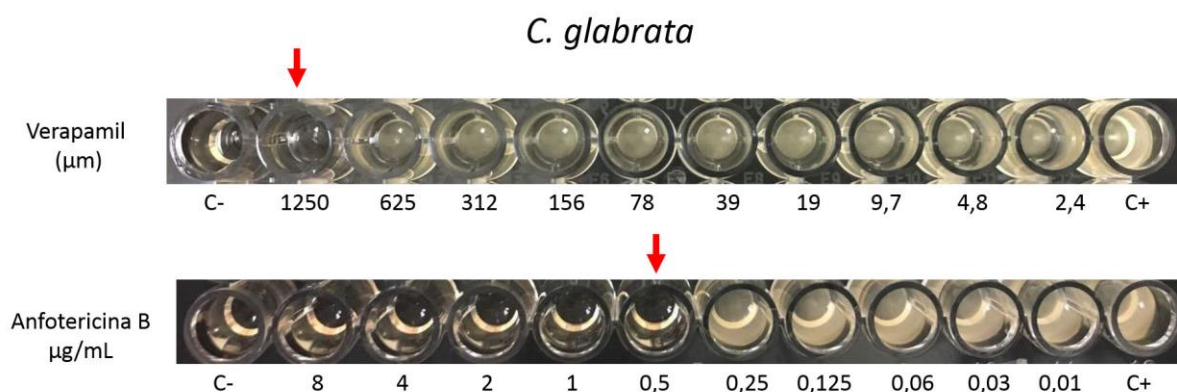
Este experimento foi repetido três vezes em dias diferentes (três experimentos independentes).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação da atividade antifúngica para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

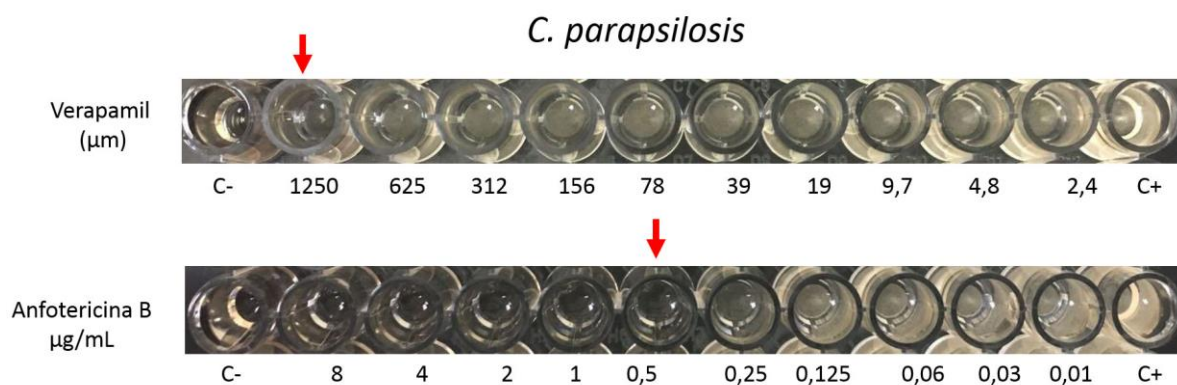
Cloridrato de Verapamil na concentração de 1250 μM demonstrou inibição de crescimento frente às espécies de *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. albicans*, como demonstrado nas Figuras 1 a 4.

Figura 1 – *C. glabrata* na presença de diferentes concentrações de Cl. de Verapamil e Anfotericina B, a seta indica o valor de CIM para os compostos analisados



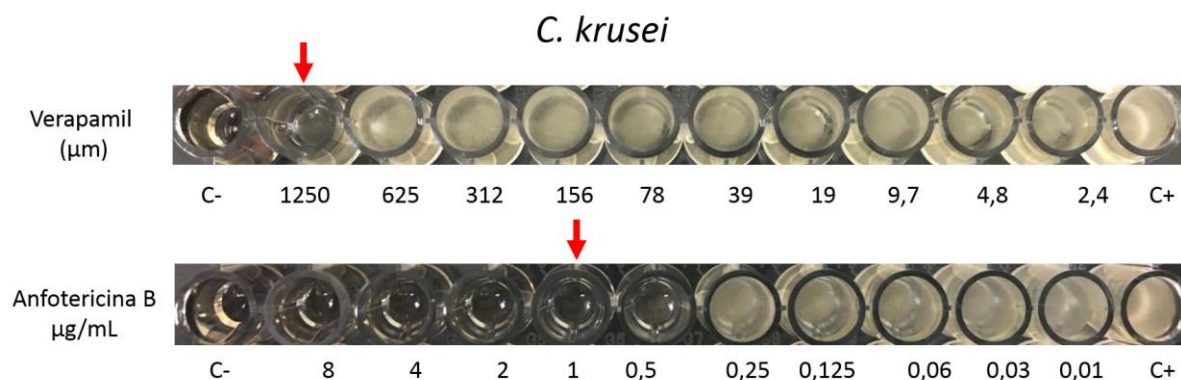
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 2 – *C. parapsilosis* na presença de diferentes concentrações de Cl. Verapamil e Anfotericina B, a seta indica o valor de CIM para os compostos analisados



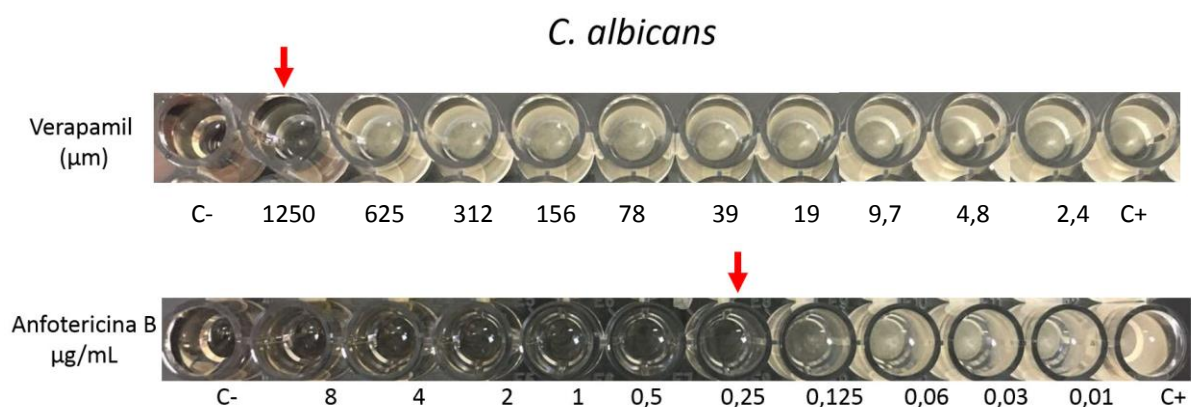
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 3 – *C. krusei* na presença de diferentes concentrações de Cl. de Verapamil e Anfotericina B, a seta indica o valor de CIM para os compostos analisados



Fonte: Elaborado pelo autor.

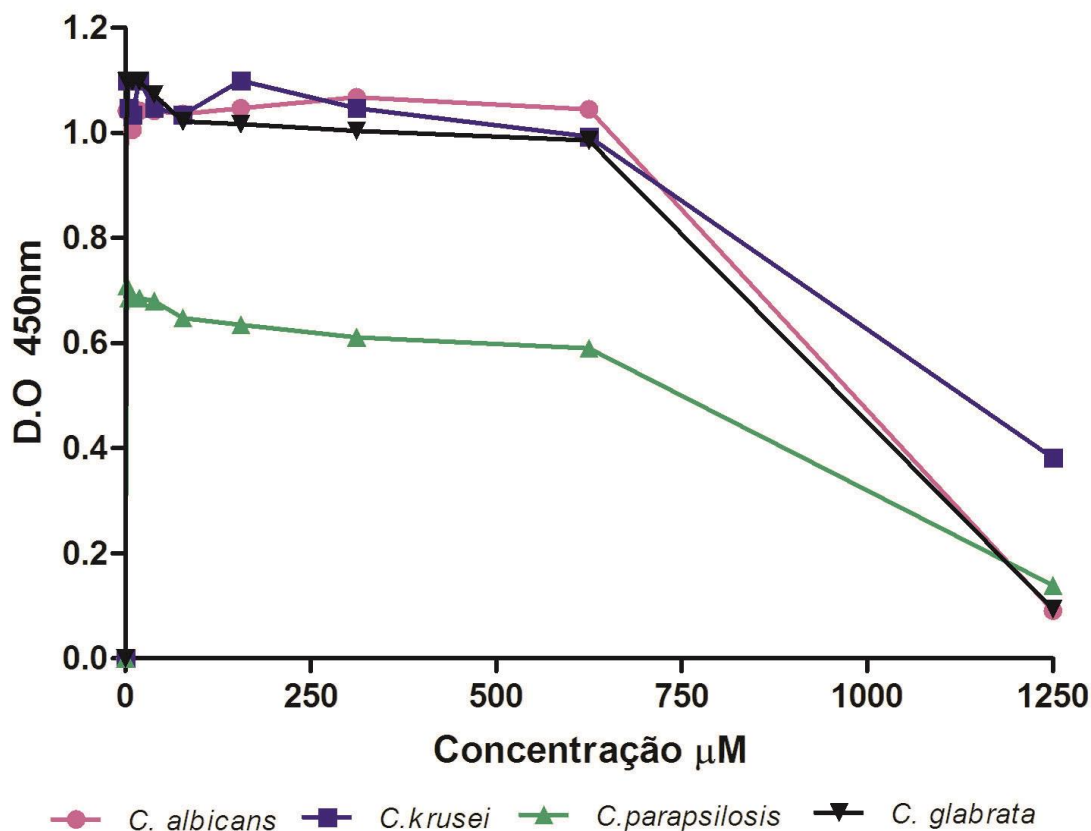
Figura 4 – *C. albicans* na presença de diferentes concentrações de Cl. de Verapamil e Anfotericina B, a seta indica o valor de CIM para os compostos analisados



Fonte: Elaborado pelo autor.

A Figura 5 apresenta uma síntese dos resultados obtidos, demonstrando a variação das densidades ópticas (DO) correspondentes às diferentes concentrações de Cloridrato de Verapamil frente as quatro espécies de *Candida*.

Figura 5 – Apresenta comportamento das quatro espécies de *Candida* frente à atividade antifúngica de Cloridrato de Verapamil



Fonte: Elaborado pelo autor.

4.2 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

No que tange à concentração fungicida mínima (CFM), o fármaco Cloridrato de Verapamil não apresentou atividade fungicida para concentrações até 1250 μm, conforme descrito na Tabela 1.

Tabela 1 – Resultados do teste de microdiluição para determinar CIM e CFM

Concentração Inibitória Mínima (CIM)			Concentração Fungicida Mínima (CFM)
	Verapamil (μM)	Anfotericina B $\mu\text{g/ml}$ (controle)	Verapamil (μM)
<i>C. albicans</i>	1250	0,25	>1250
<i>C. krusei</i>	1250	1,0	>1250
<i>C. parapsilosis</i>	1250	0,5	>1250
<i>C. glabrata</i>	1250	0,5	>1250

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 Avaliação da redução de biomassa em biofilme de *Candida* spp. após tratamento com Cloridrato de Verapamil

O efeito do fármaco Cloridrato de Verapamil também foi avaliado em biofilme com a análise de redução percentual de biomassa. Desta forma, utilizou-se para o teste, a concentração equivalente a CIM (1250 μM) e a concentração equivalente a cinco vezes o valor de CIM (1250 μM), conforme descrito nas Figura 7 e Tabela 2.

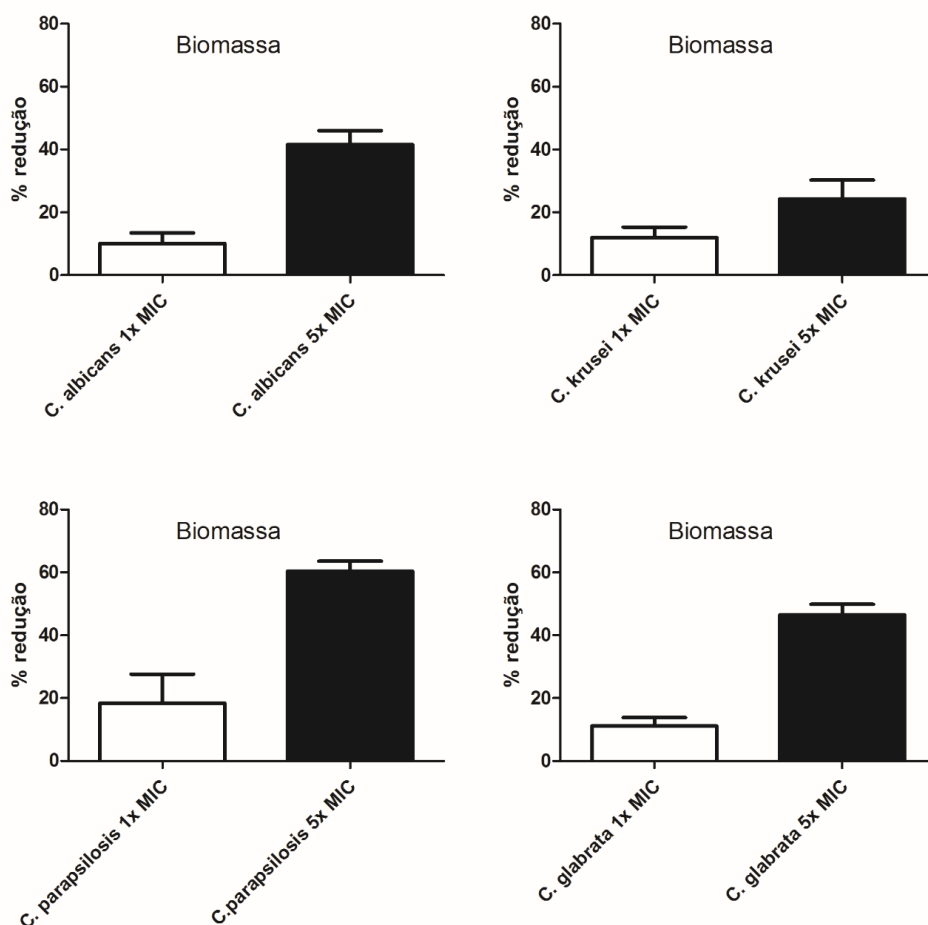
Para *C. albicans*, o percentual de redução de biomassa, quando utilizada concentração de Cloridrato de Verapamil correspondente a CIM (1250 μM), foi de 10%. Quando utilizada concentração correspondente a 5 vezes o valor de CIM (1250 μM), a redução foi de 43%.

Para *C. parapsilosis*, o percentual de redução de biomassa, quando utilizada concentração de Cloridrato de Verapamil correspondente a CIM (1250 μM), foi de 19%. Quando utilizada concentração correspondente a 5 vezes o valor de CIM (6250 μM), a redução foi de 62%.

Para *C. krusei*, os percentuais de redução de biomassa foram de 14 e 25% nas concentrações equivalentes a CIM e 5 vezes o valor de CIM, respectivamente.

Para *C. glabrata*, os percentuais de redução foram de 13% e 48% nas concentrações equivalentes a CIM e 5 vezes o valor de CIM, respectivamente.

Figura 6 – Redução de biomassa (%) em biofilme de *Candida* spp. por cristal violeta, após tratamento com o fármaco Cloridrato de Verapamil, nas concentrações equivalentes a CIM e a 5 vezes o valor de CIM



Fonte: Elaborado pelo autor.

Tabela 2 – Redução de biomassa (%) em biofilme de *Candida* spp. por cristal violeta após tratamento com Cloridrato de Verapamil nas concentrações equivalentes a CIM e a 5 vezes o valor de CIM

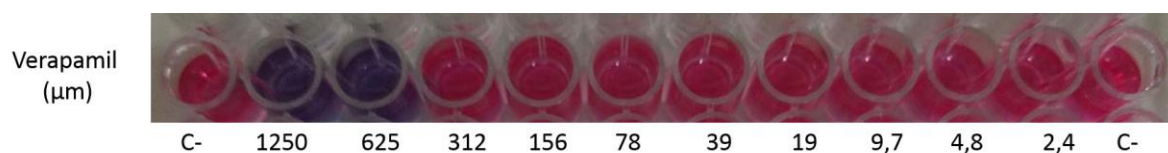
	Concentração equivalente ao valor de CIM	Concentração equivalente a 5 vezes o valor de CIM
<i>C. albicans</i>	10%	43%
<i>C. parapsilosis</i>	19%	62%
<i>C. krusei</i>	14%	25%
<i>C. glabrata</i>	13%	48%

Fonte: Elaborada pelo autor.

4.4 Avaliação da viabilidade celular (citotoxicidade *in vitro*) por meio da reação de redução da resazurina

A avaliação qualitativa da viabilidade celular do fármaco Cloridrato de Verapamil, para as concentrações mais elevadas (625 e 1250 μM), demonstrou que não houve reação de redução da resazurina, não apresentando mudança na coloração, conforme demonstrado na Figura 5.

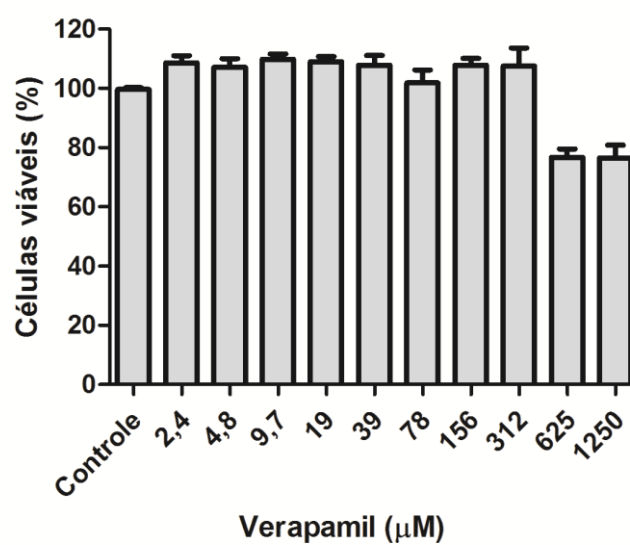
Figura 7 – Células HaCat na presença de diferentes concentrações de Cloridrato de Verapamil



Fonte: Elaborada pelo autor.

A avaliação quantitativa da viabilidade celular foi demonstrada pela relação entre a concentração do Cloridrato de Verapamil (μM) pela porcentagem de células viáveis. Na Figura 6, nota-se que, este fármaco não apresentou citotoxicidade *in vitro* frente a células de queratinócitos humanos, pois a redução de células viáveis demonstrada nas concentrações mais elevadas (625 e 1250 μM) não apresentou valores inferiores a 70%, conforme descrito na norma ISO 10993-5 (2009).

Figura 8 - Relação entre a concentração de Cloridrato de Verapamil (μM) pela porcentagem de células viáveis



Fonte: Elaborada pelo autor.

5 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, vivenciamos um aumento expressivo da frequência de infecções fúngicas. Tal elevação pode estar associada a diversos fatores, tal como o incremento de pacientes imunodeprimidos, a evolução das ciências médicas, e em especial, o aparecimento de resistência a agentes antimicrobianos. Em paralelo a evolução desta condição patológica, observamos também um aumento na procura de novos compostos (alguns em estágios de desenvolvimento clínico) que atuem de forma eficaz e ao mesmo tempo apresentem menores efeitos adversos para o hospedeiro (Maesaki, 2002).

Atualmente a terapia mais utilizada no tratamento de candidíases invasivas recorre a um número limitado de fármacos antifúngicos, como a anfotericina B, o fluconazol e o itraconazol (Carrillo-Muñoz et al., 2006).

O termo drogas "não antifúngicas" relaciona-se com uma variedade de compostos que são empregados em diferentes patologias não fúngicas, mas demonstraram exibir atividade antifúngica de amplo espectro. O papel desses agentes na epidemiologia e nas manifestações clínicas de infecções fúngicas, assim como, o potencial de certas drogas para o tratamento de infecções por fungos invasivos requer estudos mais aprofundados (Afeltra, Verweij, 2003).

Vários compostos orgânicos têm a capacidade de inibir e bloquear o influxo de cálcio. Estes canais estão presentes nas leveduras e fungos e, portanto, são potenciais alvos para novos compostos antifúngicos. Os fármacos Cloridrato de Verapamil, cinarizina, nifedipina e nimodipina, sozinhos ou em combinação com cetoconazol foram testados contra isolados clínicos de *Candida albicans*. Estas drogas sozinhas exibiram atividade antifúngica *in vitro* em altas concentrações, sendo que o Cloridrato de Verapamil demonstrou ser mais ativo que os demais (Afeltra, Verweij, 2003).

Alguns estudos foram realizados com o intuito de investigar o efeito *in vitro* e *in vivo* do fármaco Cloridrato de Verapamil (Afeltra, Verweij, 2003; Yu et al., 2014; Li et al., 2015; Nazik et al., 2017).

Como resultado desses estudos, obteve-se que a exposição a $\geq 10 \mu\text{g/mL}$ de Cloridrato de Verapamil levou a uma diminuição significativa no desenvolvimento de

hifas de células de *C. albicans*, e a exposição a ≥ 20 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou uma inibição da capacidade de aderir à superfície bucal e a células epiteliais. Estes efeitos inibitórios estão relacionados ao mecanismo de inibição da expressão e do transporte de Hwp1, indicando atividade deste fármaco contra a rede de regulação das proteínas associadas à morfogênese das hifas em *C. albicans*. Além disso, o tratamento com Cloridrato de Verapamil em 10 mg/(kg/dia) levou a uma diminuição notável na colonização gastrointestinal de células de *C. albicans* (Yu et al., 2014).

O efeito inibitório de Cloridrato de Verapamil, no que se refere ao desenvolvimento de hifas, adesão e colonização gastrointestinal, demonstrou que este fármaco pode ser considerado uma terapia antifúngica de escolha contra a colonização e a infecção por *C. albicans* (Yu et al., 2014).

Não obstante, a investigação sobre os mecanismos pelos quais os bloqueadores de canais de cálcio inibem a morfogênese de *C. albicans* e a sinergia entre o fármaco Cloridrato de Verapamil e outros agentes antifúngicos é provável que tenha um impacto no desenvolvimento de novas e eficazes terapias contra as infecções por *C. albicans*.

O estudo desenvolvido por Li et al. (2015) corroborou os achados de Yu et al. (2014), e concluiu que ao invés de matar as células de fungos, o que requer uma especificidade bastante alta e pode levar ao surgimento de nova resistência, inibir o crescimento e os fatores de virulência em células fúngicas representa uma boa alternativa para o desenvolvimento de novas drogas antifúngicas.

Os demais estudos, também, demonstraram a eficácia do Cloridrato de Verapamil contra o biofilme de *Candida* e o crescimento de hifas *in vitro*. Com base nesses resultados, Nazik et al. (2017) desenvolveram um estudo o qual demonstrou a atividade deste fármaco contra o biofilme de *Aspergillus*.

A capacidade de formar biofilmes é considerada um dos principais fatores de virulência das espécies de *Candida* e oferecem várias vantagens para estes micro-organismos, como maior proteção contra as defesas imunes do hospedeiro e ação de agentes antimicrobianos (Giolo, Svidzinski, 2010). Os biofilmes são comunidades microbianas estruturadas ligadas à superfície biótica ou abiótica embutida em uma matriz exopolímera constituída principalmente por carboidratos, hexossaminas, ácidos urônicos, proteínas e ácidos nucleicos (Mitchell et al., 2016).

A manutenção da arquitetura de biofilmes pode ser assegurada pela

formação de canais e colunas, que permitem a passagem de nutrientes e oxigênio para toda a comunidade microbiana (Mitchell et al., 2016). Desta forma, as células presentes em biofilmes são mais resistentes quando comparadas às células planctônicas, demonstrando que o crescimento indesejado de biofilmes tem um impacto negativo, sobretudo na área da saúde (Xavier, 2003).

Algumas infecções causadas pela utilização de dispositivos médicos, tais como cateteres, estão relacionadas a formação de biofilmes, cuja resistência das células, associada à falta de métodos eficazes de desinfecção e limpeza, culminam em um aumento nos índices de infecção (Xavier, 2003).

Um dos desafios na área odontológica é reduzir a formação de biofilmes nas superfícies dentárias, devido ao seu potencial cariogênico. Enxaguatórios bucais são comumente indicados no controle químico da placa bacteriana, além de remover biofilmes formados na cavidade bucal (Bugno et al., 2006). Poucos estudos demonstraram uma atividade antimicrobiana de amplo espectro nos enxaguatórios bucais, eficazes tanto contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, como contra o gênero *Mycobacterium*, bactérias anaeróbias, esporos e fungos do gênero *Candida* (Bugno et al., 2007).

Com relação aos resultados obtidos para Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), estudos anteriores (Li et al., 2015; Yu et al., 2014) demonstraram que o Cloridrato de Verapamil não tem atividade fungicida, ratificando a atividade fungistática demonstrada pelo fármaco nesse estudo.

Como o Cloridrato de Verapamil é comumente utilizado para o tratamento de doenças cardiovasculares em concentrações mais elevadas do que as utilizadas neste estudo, o fato desse fármaco não apresentar citotoxicidade *in vitro* frente a células de queratinócitos humanos, viabiliza, portanto, a atividade antifúngica em células epiteliais nas concentrações avaliadas.

Com relação à atividade do Cloridrato de Verapamil na redução de biomassa em biofilmes formados por *Candida* spp., estudos anteriores (Yu et al., 2014) demonstraram o efeito inibitório desse fármaco no desenvolvimento de hifas, na adesão e colonização gastrointestinal, e na manutenção de biofilmes de *Candida albicans*. Porém, não foram encontrados estudos mostrando a atividade do fármaco contra a formação ou manutenção de biofilmes por demais espécies de *Candida*.

Além disso, a maioria dos estudos inferem que, a atividade antifúngica desse fármaco, fundamenta-se na inibição da filamentação presente nas células fúngicas. No entanto, obtivemos nesse estudo, resultados demonstrando a atividade antifúngica em células de *Candida glabrata*, espécie não filamentosa do gênero.

Haja vista que os resultados obtidos para avaliação da atividade antifúngica (CIM e CFM), avaliação da citotoxicidade *in vitro* do fármaco e avaliação da redução de biomassa em biofilmes formados pelas principais espécies patogênicas de *Candida*, corroboram os dados da literatura, reforçando a atividade antifúngica demonstrada pelo fármaco Cloridrato de Verapamil, embora existam poucos estudos relacionando a atividade antifúngica desse fármaco frente às espécies não *albicans* de *Candida*.

Conforme descrito anteriormente, as espécies de *Candida* fazem parte da microbiota bucal de aproximadamente 50% da população. Entretanto, sob determinadas condições, podem comportar-se como patógenos oportunistas, produzindo infecções que vão desde lesões nas mucosas superficiais até disseminações sistêmicas graves e invasivas, potencialmente fatais em pacientes imunocomprometidos (Yu et al., 2014; Pfaller, Diekema, 2004).

Além de causar diversas formas de candidoses, essas leveduras podem estar envolvidas em lesões endodônticas persistentes e doenças periodontais. Somado a este fato, o uso prolongado de agentes antimicrobianos pode alterar a microbiota residente da cavidade bucal, proporcionando o crescimento de microrganismos potencialmente patogênicos (Giolo, Svidzinski, 2010; Mitchell et al., 2016).

Desta forma, a utilização desse fármaco pode ser útil no controle e manutenção da saúde oral, seja como agente terapêutico associado a outros agentes antifúngicos, ou no desenvolvimento de enxaguatórios bucais (colutórios orais) no controle da placa bacteriana, como método preventivo de doenças prevalentes na cavidade oral.

6 CONCLUSÃO

O fármaco Cloridrato de Verapamil demonstrou atividade antifúngica contra as espécies patogênicas avaliadas no presente estudo: *Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e *Candida glabrata*.

Cloridrato de Verapamil, na concentração de 1250 µM, demonstrou inibição de crescimento para as espécies *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. albicans*, porém não apresentou atividade fungicida em concentrações até 1250 µM, sendo considerado, portanto, um fármaco fungistático.

Cloridrato de Verapamil não apresentou também, citotoxicidade *in vitro* nas concentrações avaliadas nesse estudo, pois a avaliação quantitativa de células viáveis demonstrada nas concentrações mais elevadas (625 e 1250 µM) não apresentou valores inferiores a 70%. Além disso, Cloridrato de Verapamil foi ativo na redução de biomassa em biofilme formado pelas espécies avaliadas nesse estudo, demonstrando que, o aumento da concentração do fármaco resulta em um aumento na porcentagem de redução de biomassa.

Portanto, podemos inferir que o fármaco Cloridrato de Verapamil tem potencial para compor novas formulações antifúngicas, sobretudo de uso tópico, como enxaguatórios bucais.

REFERÊNCIAS *

Abbas J, Bodey GP, Hanna HA, Mardani M, Girgawy E, Abi-Said D, et al. *Candida krusei* fungemia. An escalating serious infection in immunocompromised patients. *Arch Intern Med*. 2000 Sep 25;160(17):2659-64. PubMed PMID: 10999981.

Afeltra J, Verweij PE. Antifungal activity of nonantifungal drugs. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2003 Jul;22(7):397-407. Epub 2003 Jun 26. Review. PubMed PMID: 12884072.

Almirante B, Rodríguez D, Cuenca-Estrella M, Almela M, Sanchez F, Ayats J, et al. Epidemiology, risk factors, and prognosis of *Candida parapsilosis* bloodstream infections: case-control population-based surveillance study of patients in Barcelona, Spain, from 2002 to 2003. *J Clin Microbiol*. 2006 May;44(5):1681-5. PubMed PMID: 16672393.

Brito LR, Guimarães T, Nucci M, Rosas RC, Paula Almeida L, Da Matta DA, et al. Clinical and microbiological aspects of candidemia due to *Candida parapsilosis* in Brazilian tertiary care hospitals. *Med Mycol*. 2006 May;44(3):261-6. PubMed PMID: 16702106.

Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Avaliação da eficácia antimicrobiana de produtos comercialmente disponíveis. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2006;65(1):40-5.

Bugno A, Nicoletti MA, Almodóvar AAB, Pereira TC, Auricchio MT. Antimicrobial efficacy of *Curcuma zedoaria* extract as assessed by linear regression compared with commercial mouthrinses. *Braz J Microbiol*. 2007 Sept;38(3):440-5.

Carlo HL, Ferreira GL, Pérez AL, Rocha ÍM, Pinheiro MA, de Castro RD, et al. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2015:147804. doi: 10.1155/2015/147804. Epub 2015 Mar 26. Review. PubMed PMID: 25883668.

Carrillo-Muñoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindós G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Esp Quimioter*. 2006 Jun;19(2):130-9.

Chen KH, Chang CT, Yu CC, Huang JY, Yang CW, Hung CC. *Candida parapsilosis* peritonitis has more complications than other *Candida* peritonitis in peritoneal dialysis patients. *Ren Fail*. 2006;28(3):241-6. PubMed PMID: 16703797.

Clerihew L, Lamagni TL, Brocklehurst P, McGuire W. *Candida parapsilosis* infection in very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed*. 2007 Mar;92(2):F127-9. PubMed PMID: 17337658.

* Baseado em: International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Sample References [Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [atualizado 04 nov 2015; acesso em 25 jan 2016]. U.S. National Library of Medicine; [about 6 p.]. Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html.

Coronado-Castellote L, Jiménez-Soriano Y. Clinical and microbiological diagnosis of oral candidiasis. *J Clin Exp Dent*. 2013 Dec 1;5(5):e279-86. doi: 10.4317/jced.51242. eCollection 2013 Dec 1. Review. PubMed PMID: 24455095.

Dabas P. An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. *J Yeast Fungal Res*. 2013;4(6):63-74.

Fu JY, Hua H, Yan ZM, Zhang LW. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2016 Apr;22(3):185-95. doi: 10.1111/odi.12380. Epub 2015 Dec 4. Review. PubMed PMID: 26456226.

Geiger AM, Foxman B, Sobel JD. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and no *Candida*. *Genitourin Med*. 1995; 71:304–7.

Giolo MP, Svidzinski TIE. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(3):225-34. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1676-24442010000300009>.

Goodman A. As bases farmacológicas da terapêutica. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

Goldman M, Pottage JC, Weaver DC. *Candida krusei* fungemia. Report of 4 cases and review of the literature. *Medicine*. 1993;72:143–50.

Hitchcock CA, Pye GW, Troke PF, Johnson EM, Warnock DW. Fluconazole resistance in *Candida glabrata*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1993;37:1962–5.

Huber M, Terézhalmy G. Oropharyngeal candidiasis: etiology, epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Crest Oral-B at dentalcare.com Contin Educ Course*. 2011:1–16.

Jackson BE, Wilhelmus KR, Mitchell BM. Genetically regulated filamentation contributes to *Candida albicans* virulence during corneal infection. *Microbial Pathogenesis*. 2007;42(2-3):88–93.

Javed F, Romanos G, Samaranayake L. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sciences*. 2014 May;13(5):726-34. doi: 10.1039/c3pp50426c 13.

Jin L, Leung KW, Samaranayake LP. Oral mucosal fungal infections. *Periodontol* 2000. 2009. Feb;49:39-59. doi: 10.1111/j.1600-0757.2008.00291.x.

Kabir MA, Hussain MA. Human fungal pathogen *Candida albicans* in the postgenomic era: an overview. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2009 Feb;7(1):121-34. doi: 10.1586/14787210.7.1.121.

Kahn JN, Garcia-Effron G, Hsu MJ, Park S, Marr KA, Perlin DS. Acquired echinocandin resistance in a *Candida krusei* isolate due to modification of glucan synthase. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 May;51(5):1876-8. Epub 2007 Feb 26. PubMed PMID: 17325225.

Laffey SF, Butler G. Phenotype switching affects biofilm formation by *Candida parapsilosis*. *Microbiology*. 2005 Apr;151(Pt 4):1073-81. PubMed PMID: 15817776.

Li X, Hou Y, Yue L, Liu S, Du J, Sun S. Potential targets for antifungal drug discovery based on growth and virulence in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59:5885–91. doi:10.1128/AAC.00726-15.

López-Martínez R. Candidosis, a new challenge. *Clinics in dermatology*. 2010; 28:178-84.

Maccallum DM. Hosting infection: experimental models to assay *Candida* virulence. *Int J Microbiol*. 2012;2012:363764. doi: 10.1155/2012/363764. Epub 2011 Dec 22. PubMed PMID: 22235206.

Maesaki S. Drug delivery system of anti-fungal and parasitic agents. *Curr Pharm Des*. 2002;8:433-40.

Miceli M, Diaz J, Lee S. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*. 2011 Feb;11(2):142-51. doi: 10.1016/S1473-3099(10)70218-8.

Mikulska M, Del Bono V, Ratto S, Viscoli C. Occurrence, presentation and treatment of candidemia. *Expert Rev Clin Immunol*. 2012 Nov;8(8):755-65. doi: 10.1586/eci.12.52. Review. PubMed PMID: 23167687.

Mitchell KF, Zarnowski R, Andes DR. Fungal Super Glue: The Biofilm Matrix and Its Composition, Assembly, and Functions. *PLoS Pathog*. 2016 Sep 29;12(9):e1005828. doi: 10.1371/journal.ppat.1005828. eCollection 2016 Sep. PubMed PMID: 27685086.

Muñoz P, Sánchez-Somolinos M, Alcalá L, Rodríguez-Créixems M, Peláez T, Bouza E. *Candida krusei* fungaemia: antifungal susceptibility and clinical presentation of an uncommon entity during 15 years in a single general hospital. *J Antimicrob Chemother*. 2005 Feb;55(2):188-93. Epub 2005 Jan 13. PubMed PMID: 15650001.

Nazik H, Choudhary V, Stevens DA. Verapamil Inhibits *Aspergillus* Biofilm, but Antagonizes Voriconazole. *J Fungi (Basel)*. 2017 Sep 20;3(3). pii: E50. doi: 10.3390/jof3030050. PubMed PMID: 29371566.

Pan SC, Hsieh SM, Chang SC, Lee HT, Chen YC. Septic *Candida krusei* thrombophlebitis of inferior vena cava with persistent fungemia successfully treated by new antifungal agents. *Med Mycol*. 2005 Dec;43(8):731-4. PubMed PMID: 16422304.

Pelletier R, Alarie I, Lagacé R, Walsh TJ. Emergence of disseminated candidiasis caused by *Candida krusei* during treatment with caspofungin: case report and review of literature. *Med Mycol*. 2005 Sep;43(6):559-64. PubMed PMID: 16320498.

Pemán J, Jarque I, Bosch M, Cantón E, Salavert M, de Llanos R, Molina A. Spondylodiscitis caused by *Candida krusei*: case report and susceptibility patterns. *J Clin Microbiol*. 2006 May;44(5):1912-4. PubMed PMID: 1667243.

Pfaller MA, Diekema DJ. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev*. 2007 Jan;20(1):133-63. Review. PubMed PMID: 17223626.

Pfaller MA, Diekema DJ. Rare and emerging opportunistic fungal pathogens: concern for resistance beyond *Candida albicans* and *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*. 2004;42(10):4419-31.

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. *Farmacologia*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

Sajjan AC, Mahalakshmi VV, Hajare D. Prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species isolated from patients attending tertiary care hospital. *J Dent Med Sci*. 2014;13(5):44-9.

Singh A, Verma R, Murari A, Agrawal A. Oral candidiasis: An overview. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2014 Sep;18(Suppl 1):S81–S85. doi: 10.4103/0973-029X.141325.

Spellberg BJ, Filler SG, Edwards JE Jr. Current treatment strategies for disseminated candidiasis. *Clin Infect Dis*. 2006 Jan 15;42(2):244-51. Epub 2005 Dec 2. Review. PubMed PMID: 16355336.

Surarit R, Shepherd MG. The effects of azole and polyene antifungals on the plasma membrane enzymes of *Candida albicans*. *J Med Vet Mycol*. 1987 Dec;25(6):403-13.

Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol*. 2006; 51(8):672-80.doi: 10.1016/j.archoralbio.2006.02.005.

Wachtler B, Wilson D, Haedicke K, Dalle F, Hube B. From attachment to damage: defined genes of *Candida albicans* mediate adhesion, invasion and damage during interaction with oral epithelial cells. *PLoS One*. 2011;6:e17046.

Weems Jr JJ. *Candida parapsilosis*: epidemiology, pathogenicity, clinical manifestations, and antimicrobial susceptibility. *Clin. Infect. Dis*. 1992;14:756-66. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in *Candida krusei* infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. *N Engl J Med*. 1991;325:1274.

Xavier JB, Picioreanu C, Van Loosdrecht MC. A framework for multidimensional modelling of activity and structure of multispecies biofilms. *Environ Microbiol.* 2005 Aug;7(8):1085-103. PubMed PMID: 16011747.

Yu Q, 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 Jun;14(4):633-41. doi: 10.1111/1567-1364.12150.