



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA MÉDICA

DANIEL DOMINGUES FREITAS

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CURCUMINA FRENTE ÀS CEPAS DE *Candida* spp. e
Cryptococcus neoformans RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

FORTALEZA

2015

DANIEL DOMINGUES FREITAS

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CURCUMINA FRENTE ÀS CEPAS DE *Candida* spp. e
Cryptococcus neoformans RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Orientador: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior.

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências da Saúde

-
- F936a Freitas, Daniel Domingues.
Avaliação *in vitro* da curcumina frente às cepas de *Candida ssp.* e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol / Daniel Domingues Freitas. – 2015.
68 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicina, Departamento de Patologia e Medicina Legal, Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica, Mestrado em Microbiologia Médica, Fortaleza, 2015.
Área de Concentração: Microbiologia Médica.
Orientação: Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior.
1. Curcumina. 2. Fluconazol. 3. *Candida*. 4. *Cryptococcus neoformans*. I. Título.

DANIEL DOMINGUES FREITAS

**AVALIAÇÃO IN VITRO DA CURCUMINA FRENTE ÀS CEPAS DE *Candida* spp. e
Cryptococcus neoformans RESISTENTES AO FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Microbiologia Médica.

Aprovada em: 03/07/2015

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof.ª Dra. Raimunda Sâmia Nogueira Brilhante
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Bruno Coelho Cavalcanti
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Flávio Nogueira da Costa
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

Aos meus pais, Luciano e Zélia.

AGRADECIMENTO

À Deus, sempre presente e enchendo de bênçãos minha vida.

Aos meus pais, Luciano e Zélia, a minha gratidão por todo amor, apoio, dedicação, ensinamentos e incentivos na minha vida.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, pela oportunidade concedida e confiança depositada, por todos os ensinamentos e participação efetiva na minha formação profissional.

Às Ms. Cecilia Rocha da Silva e Ms. Rosana de Sousa Campos pela ajuda incomparável, apoio e participação efetiva na realização deste trabalho.

Aos amigos do LABEL, por todo o apoio e contribuição direta ou indireta nesse projeto (Anderson Ramos, Aparecida Josino, Letícia Serpa, Bruna Nascimento, Rose Anny), e principalmente ao meu irmão João Batista, pela convivência, paciência, incentivo, e amizade durante esses anos.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Médica (PPGMM) pelas oportunidades adquiridas durante essa pós-graduação.

A todos os professores do PPGMM – UFC, que contribuíram para minha formação acadêmica e aquisição de conhecimentos.

Ao Dr. Bruno Coelho Cavalcanti e ao Prof. Hemerson Yuri Ferreira Magalhães pelos seus préstimos, sugestões, informações técnicas e incentivos úteis para a vida profissional e pela oportunidade única de trabalhar com ambos.

Ao Prof. Dr. Thalles Barbosa Grangeiro e a Ms. Marina Duarte Pinto Lobo pela dedicação e contribuição para a realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

“As dores lapidam a sabedoria, as falhas constroem a tolerância, as perdas geram novas conquistas, os fracassos nos tornam mais fortes.”
(Augusto Cury)

RESUMO

Tendo em vista que algumas propriedades terapêuticas da curcumina já são bem descritas, dessa forma o presente estudo aponta para um efeito antifúngico da curcumina frente a cepas de leveduras patogênicas resistentes ao fluconazol, cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*. Todas as cepas estudadas foram inibidas pela curcumina, com diferentes graus de inibição entre as espécies com CIMs variando entre 8-64 µg/mL. Após a exposição das cepas de *C. albicans* a curcumina, foi observado uma diminuição no número de células viáveis, indicando assim danos às membranas celulares, com possível comprometimento de suas funções. Os nossos resultados revelaram que após o tratamento com a curcumina, constatamos uma intensificação na marcação com PI (Iodeto de propídio), indicando alterações nas membranas celulares. No presente trabalho, a função mitocondrial das células de *C. albicans* parece ter sido afetada após exposição à curcumina. O colapso no $\Delta\psi_m$ (Potencial Transmembrana Mitocondrial) pode conduzir a aberturas de poros transientes nas membranas mitocondriais. Em relação aos diversos mecanismos de ação descritos para a curcumina, existem evidências de que o DNA é um dos alvos celulares desta molécula. Nossos dados sugerem que após a exposição à curcumina, as células de *C. albicans*, apresentaram quebras totais nas cadeias de DNA. Em conclusão, o composto curcumina apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol. Além de promover danos ao DNA e externalização da fosfatidilserina, o respectivo composto parecem atuar em sítios específicos próximos a mitocôndria das células de *C. albicans*, levando à morte por apoptose.

Palavras-chave: Curcumina. Fluconazol. *Candida*. *Cryptococcus neoformans*.

ABSTRACT

Considering that some therapeutic properties of curcumin are well described, so the present study points to an antifungal effect of curcumin against strains of pathogenic yeasts resistant to fluconazole, strains of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*. All strains studied were inhibited by curcumin with different degrees of inhibition among species with MICs ranging from 8-64 mg / ml. After exposure strains of *C. albicans*, curcumin a decrease in the number of viable cells was observed, thus indicating damage to cell membranes, with possible compromise of their functions. Our results showed that after treatment with curcumin, found in more intense staining with PI (Propidium iodide), indicating changes in cell membranes. In this study, the mitochondrial function of *C. albicans* cells appears to have been affected after exposure to curcumin. The collapse in $\Delta\psi_m$ (Mitochondrial Transmembrane Potential) can lead to openings of transient pores in the mitochondrial membranes. In relation to the different mechanisms of action described for curcumin, there is evidence that DNA is one of the cellular targets of this molecule. Our data suggest that after exposure to curcumin, cells of *C. albicans* showed total breaks in DNA strands. In conclusion, the compound curcumin has antifungal activity in vitro against strains of *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans* resistant to fluconazole. In addition to promoting DNA damage and externalization of phosphatidylserine, the respective compound seem to act at specific sites near mitochondria of *C. albicans* cells, leading to death by apoptosis.

Keywords: Curcumin. Fluconazole. *Candida*. *Cryptococcus neoformans*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Estrutura química da curcumina30
- Figura 2 - Avaliação por citometria de fluxo da redução no número de células viáveis, em uma única cepa representativa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada com FLC (64 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL) e Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM) por 24 horas de exposição * p <0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls 42
- Figura 3 - Avaliação da integridade de membrana determinada pelo ensaio de exclusão por iodeto de propídeo (IP), em uma única cepa representativa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada com FLC (64 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL) e Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM), por 24 horas de exposição.* p <0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls 42
- Figura 4 - Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC. As células foram marcadas com rodamina 123 (50 nM). O gráfico mostra as cepas tratadas com FLC (64 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL) e Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM), por 24 horas de exposição.* p <0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls 43
- Figura 5 - Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa, em *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC (64 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL) e a Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM) por 24 horas de exposição 44
- Figura 6 - Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa modificada (FPG e ENDO III), em *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC (64 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL) e Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM) por 24 horas de exposição 44
- Figura 7 - Externalização da fosfatidilserina pela marcação com anexina V. A intensidade de fluorescência indica a quantidade de células com exposição da fosfatidilserina quando tratadas com a Curcumina (CIM, 2xCIM, 4xCIM). * p <0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls..... 45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeito antifúngico da Curcumina frente a cepas de leveduras isoladas de amostras clínicas	41
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
CVV	Candidíase vulvovaginal
CVVR	Candidíase vulvovaginal recorrente
IFIs	Infecções fúngicas invasivas
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida.
OMS	Organização Mundial de Saúde
GTS	Glutathione sintetase
TNF- α	Fator de necrose tumoral- α
COX	Ciclooxigenase
IL	Interleucinas
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa- β
ATCC	American Type Culture Collection
CIM	Concentração inibitória mínima
LACEN	Laboratório Central de saúde pública do estado do Ceará
LABEL	Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras
PCR	Reação em cadeia da polimerase
MCC	Microdiluição em caldo
S	Sensível
SDD	Dose-dependente
R	Resistentes
Anfo B	Anfotericina B
PBS	Tampão fosfato salina
FPG	DFrmamidopirimidina DNA-glicosilase
ENDO III	Endonuclease III
PPB	Tampão de fosfato de potássio
PI	Iodeto de propídio
UFC	Universidade Federal do Ceará
$\Delta\psi_m$	Potencial transmembrana mitocondrial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Infecções fúngicas	17
2.2	Epidemiologia das candidemias	18
2.3	Epidemiologia das criptococoses	21
2.4	Arsenal farmacológico para o tratamento antifúngico	22
2.4.1	Poliênicos	23
2.4.2	Triazólicos	24
2.4.3	Equinocandinas	25
2.5	Resistência ao fluconazol	25
2.6	Testes de susceptibilidade aos fármacos antifúngicos	26
2.7	Importância dos recursos naturais como possíveis fontes de obtenção de novos fármacos	27
2.8	Compostos de plantas com atividade antifúngica	28
2.9	Curcumina	30
3	HIPÓTESES	33
4	OBJETIVOS	34
4.1	Objetivo geral	34
4.2	Objetivos específicos	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	Drogas e microrganismos	35
5.2	Identificação Molecular das leveduras	35
5.3	Testes de sensibilidade antifúngica	35
5.4	Preparação da suspensão	36
5.5	Tratamento das células de <i>C. albicans</i>	36
5.6	Determinação do número de células viáveis e da integridade de membrana das células de <i>C. albicans</i>	37
5.7	Avaliação do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) das células de <i>C. albicans</i>	37
5.8	Ensaio do cometa alcalino	37
5.9	Análise da oxidação das bases purinas e pirimidinas do DNA de células de <i>C. albicans</i>	38

5.10	Marcação por AnexinaV	39
5.11	Análise estatística	39
6	RESULTADOS	40
6.1	Atividade antifúngica do composto Curcumina frente a cepas de leveduras patogênicas resistentes ao fluconazol	40
6.2	Perda da viabilidade celular e danos na membrana plasmática da cepa de <i>Candida albicans</i> tratadas com o composto curcumina	40
6.3	Avaliação do Potencial Transmembrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)	43
6.4	Danos ao DNA	43
6.5	Externalização da Fosfatidilserina em células de <i>C. albicans</i> após exposição a curcumina	45
7.	DISCUSSÃO	46
8.	CONCLUSÃO	50
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	51

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, o aparecimento de novos agentes infecciosos muitos dos quais oportunistas patogênicos, tem vindo a contribuir para as alterações profundas no padrão das infeções fúngicas humanas.

As infeções fúngicas causadas pelo gênero *Candida* é uma preocupação na medicina clínica relacionada com a saúde pública, devido estas infeções apresentarem alta prevalência em diferentes centros médicos, como também por suas complicações, difícil diagnóstico, além de estarem associadas à mortalidade atribuída da ordem de 30 e 50% em crianças e adultos. (NUCCI *et al.*, 2013; COLOMBO, 2007). Associado a isso, elas prolongam a permanência do paciente no hospital, aumentando os custos associados a ele (GUIMARÃES *et al.*, 2012; FELL; BOEKHOUT, 2011; SCHMALRECK *et al.*, 2012).

As candidemias são consideradas as mais frequentes das micoses invasivas, representando 80% das infeções fúngicas hospitalares. *Candida* spp. é considerada atualmente o quarto agente de infeções na corrente sanguínea (representando de 8 a 10% dos casos), devido a um aumento de 500% em sua incidência a partir da década de 80 (COLOMBO *et al.*, 2007; PASQUALOTTO *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007; BERGAMASCO *et al.*, 2012).

Outra infeção fúngica de caráter oportunista, que também representa um problema de saúde pública em todo o mundo, atingindo não somente indivíduos imunocomprometidos, mas também os imunocompetentes, são as infeções ocasionadas pelo gênero *Cryptococcus* (DEL POETA; CASADEVALL, 2011; MEZZARI, 2013).

Cryptococcus é causador da criptococose, uma micose de natureza sistêmica cuja infeção ocorre através da inalação de leveduras do *Cryptococcus*. Esse fungo é encapsulado por polissacarídeos, podendo está presente em excretas de pombos e em árvores (SOUZA *et al.*, 2006; BALTASAR; RIBEIRO, 2008; FILIÚ *et al.*, 2002; SIDRIM; ROCHA, 2010).

O gênero *Cryptococcus* contém aproximadamente 48 espécies, sendo duas clinicamente relevantes, o *Cryptococcus neoformans* e o *Cryptococcus gattii*. A abrangência da criptococose por *C. neoformans* predomina quando associada a condições de baixa imunidade celular. Essa característica se deve à sua tendência em infectar indivíduos imunocomprometidos, particularmente aqueles infectados com o vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV), ocasionando óbito com frequência, sendo o índice elevado mundialmente. Dessa forma, a criptococose é atualmente considerada a doença oportunista com maior

morbidade e mortalidade entre os pacientes soropositivos (KRONSTAD, 2011; DEL POETA; CASADEVALL, 2011).

Apesar dos avanços nas últimas duas décadas, com a introdução de novas técnicas de diagnóstico e procedimentos invasivos, bem como o desenvolvimento e comercialização de novos agentes antifúngicos e da implementação de estratégias de prevenção das candidemias, a incidência de infecções tem aumentado (GUINÉ, 2014).

As principais classes de antifúngicos disponíveis no mercado compreendem os azólicos, os poliênicos e as cancidas. Após a introdução dos azóis, que possuem uma biodisponibilidade oral e uma baixa incidência de efeitos colaterais, uma nova era no tratamento de infecções fúngicas começou. Entretanto, após muito tempo observou-se que o tratamento com azóis estava fracassando. Estudos relataram que um dos motivos para este fracasso ocorreu devido à resistência de espécies de *Candida* aos agentes antifúngicos. O uso global de fluconazol é a principal causa da resistência, e tem impulsionado o desenvolvimento e a busca de novos antifúngicos (NEGRI *et al.*, 2014; NYILASI *et al.*, 2010; NUCCI; COLOMBO, 2002).

Produtos naturais oriundos de plantas têm atraído interesse científico mais recentemente, por suas propriedades antifúngicas (PARK *et al.*, 2011; CAVALEIRO *et al.*, 2006). A pesquisa neste campo pode conduzir ao desenvolvimento de drogas efetivas contra fungos patogênicos (MONDELLO *et al.*, 2006).

Diante deste pressuposto a Curcumina surge como uma possível fonte para obtenção de compostos com atividade antifúngica tendo em vista o fato de haver uma carência de estudos relacionados ao desenvolvimento biotecnológico de um fitoproduto, principalmente com propriedades anticandida.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antifúngico, *in vitro*, da curcumina frente a cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol. Bem como investigar o possível mecanismo de ação da curcumina através de citometria de fluxo e o teste do cometa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Infecções fúngicas

Nas últimas décadas diversos fatores relacionados com o avanço da medicina, como a introdução de novas técnicas diagnósticas e invasivas, a maior eficácia nas técnicas de transplantes e o uso de agentes imunossupressores e quimioterápicos têm sido responsabilizados pelo aumento de sobrevivência dos pacientes (KOTHAVADE *et al.*, 2010; SCHMALRECK *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2012).

Entretanto, infecções oportunistas, como as infecções causadas por fungos, surgiram como complicações nestes pacientes imunocomprometidos. Dentre as infecções fúngicas oportunistas, a candidíase tem sido aquela mais documentada nos diferentes grupos de pacientes portadores de imunodeficiências, apresentando-se como infecções superficiais ou invasivas, com envolvimento de um ou múltiplos órgãos (SILVA *et al.*, 2012).

O gênero *Candida*, pertencente ao filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales, engloba leveduras de importância clínica e científica que podem tornar-se patogênicas e causar candidíases que vão desde infecções superficiais de mucosas, como as vulvovaginais ou candidíases orofaríngeas, até infecções sistêmicas, do sangue (candidemia) e do líquido cefalorraquidiano (BRANCO, 2012). O gênero *Candida* continua sendo o mais importante patógeno a causar micoses oportunistas, em todo o mundo e uma das principais causas de infecção nosocomial da corrente sanguínea (NUCCI *et al.*, 2010).

Em certas circunstâncias, *Candida* spp. pode causar infecções que vão desde candidíase vaginal, até candidíase orofaríngea e infecções sistêmicas disseminadas. A grande maioria das mulheres apresenta pelo menos um episódio de candidíase vulvovaginal (CVV) durante a vida e cerca de 5% delas apresentam candidíase vulvovaginal recorrente (CVVR), que se caracteriza por pelo menos três infecções anuais no qual o principal patógeno é *C. albicans* sendo responsável por 85 a 95% de todas as CVV (OMBRELLA *et al.*, 2008; CHASSOT *et al.*, 2008; ROSENTUL *et al.*, 2009; HARRIOTT *et al.*, 2010; RAD *et al.*, 2011).

A frequência de infecções causadas por espécies de *Candida* possui relação estreita com fatores de risco bem definidos para o seu surgimento e/ou agravamento, comum a maioria das espécies, como por exemplo, hospitalização prolongada, pacientes neutropênicos, com câncer, pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos, recém-nascidos prematuros, tratamentos invasivos, uso de antibióticos de amplo espectro (NUCCI *et al.*, 2010;

CORNISTEIN *et al.*, 2013), nutrição parenteral, tratamentos com corticosteróides, diabetes, lesões da epiderme e derme, desnutrição e pacientes expostos a múltiplos procedimentos invasivos (HINRICHSEN *et al.*, 2008; KATHIRAVAN, *et al.*, 2012). Cada um destes fatores pode elevar o risco de candidemia nosocomial em 1,7 a 18 vezes sobre os controles sem estes fatores específicos ou exposições (MIRANDA, 2007).

A candidemia é, geralmente, difícil de diagnosticar e tratar, com taxas de mortalidade em cerca de 50%, representando assim, um importante problema de saúde pública em pacientes com alto risco de infecção, acarretando no aumento dos custos com saúde pública e, no aumento da duração da internação hospitalar (CHOU *et al.*, 2007; MORAGE *et al.*, 2011; GUIMARÃES *et al.*, 2012; WILLE *et al.*, 2013).

Das espécies de *Candida* spp. isoladas, a *albicans* continua sendo a mais prevalente. No entanto, nos últimos anos, o número de infecções devido a *Candida* não *albicans* tem aumentado significativamente com o aumento da prevalência de espécies como *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012; CHI *et al.*, 2011; GAMARRA *et al.*, 2010). Esse aumento pode estar parcialmente relacionado com melhorias dos métodos de diagnóstico bem como a introdução de técnicas moleculares na rotina diagnóstica de fungemia. Aliás, pode ser também reflexo do seu nível inerentemente maior de resistência a certas drogas antifúngicas em comparação com *C. albicans* (SILVA *et al.*, 2012).

2.2 Epidemiologia das Candidemias

A Rede Nacional de Segurança de Saúde informou que a *Candida* spp. é a terceira causa mais comum de infecção sanguínea associada às unidades de terapia intensiva nos Estados Unidos (DIEKEMA *et al.*, 2012). Contudo, apesar de *C. albicans* figurar como a levedura mais importante, um notável crescimento de infecções por espécies não-*albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*) tem sido constatado com patamares que correspondem entre 36-63% de todos os casos reportados (HORN *et al.*, 2009; GAMARRA *et al.*, 2010; CHI *et al.*, 2011).

Conforme a análise realizada por Pfaller e colaboradores (2010) em 142 diferentes centros médicos de vários lugares do mundo: Ásia-Pacífico (24 locais), América Latina (16 locais), Europa (18 locais), África/Oriente Médio (11 locais), e América do Norte (13 locais) no período de 1997 a 2007, foram isolados 256.882 cepas de *Candida* spp. Destas, um total de 31 espécies de *Candida* foram isoladas, das quais as cinco espécies mais comuns foram *C.*

albicans, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* responsável por 92% de todos os isolados durante os 7 anos de estudo.

Em um estudo realizado nos EUA, com 2019 pacientes, foi evidenciado uma prevalência de candidemia causada por espécies de *Candida* não *albicans* em 54,4% dos pacientes, onde este resultado demonstrou ser superior à incidência de candidemia causada por *C. albicans* (45,6%) (HORN *et al.*, 2009).

Em um trabalho feito por Kreuzsch e Karstaedt (2013) na África, constatou a distribuição das espécies de *Candida* em adultos com candidemia ao longo de 1990, 1998 a 2002 e de 2005 a 2007 foi num total de 268 casos, dentre eles, destacamos: 123 isolados de *C. albicans*, 67 isolados de *C. parapsilosis*, 58 isolados de *C. glabrata*, 9 isolados para *C. kruseii* e *C. tropicalis* e 1 isolados para as espécies *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*.

Bassetti e colaboradores (2015) verificaram, em um estudo realizado em Santa Maria della Misericordia University Hospital (Itália) entre janeiro de 2009 e junho 2014 um total de 204 episódios de candidemia, incidência de 0,79 episódios / 1.000 admissões. Onde *C. albicans* isolou-se em 60,3% dos casos, seguido de *C. parapsilosis* (16,7%), *C. glabrata* (11,8%) e *C. tropicalis* (6,4%).

Estudos de Mokaddas, Al-Sweih e Khan (2007) apresentaram a distribuição das espécies e sensibilidade antifúngica no Kuwait, um país subdesenvolvido, no período de 1996 a 2005, de isolados da corrente sanguínea. Ao todo foram 607 isolados de leveduras, na qual *Candida albicans* foi a espécie predominante (39,5%), seguido por *Candida parapsilosis* (30,6%), *Candida tropicalis* (12,4%) e *Candida glabrata* (5,6%).

Nucci e colaboradores (2013), verificaram a incidência de infecções fúngicas em 21 hospitais terciários da América Latina, durante os períodos de novembro de 2008 e outubro de 2010, revelando uma incidência global de 1,18 casos por 1.000 admissões e 0,23 casos por 1000 pacientes/dia, no qual as espécies mais encontradas foram: *C. albicans* (37,6%), seguido de *C. parapsilosis* (26,5%), *C. tropicalis* (17,6%), *C. guilliermondii* (6,5%), *C. glabrata* (6,3%), e *C. krusei* (2,7%).

Na Argentina, em um estudo realizado por Caeiro e colaboradores (2014) baseado em resultados laboratoriais coletados em 5 diferentes hospitais terciários da cidade de Córdoba entre os anos de 2010 e 2012 verificou-se 158 pacientes com candidemias, desse total, 65 (41%) eram *C. albicans*, 31 (20%) *C. parapsilosis*, 19 (12%) *C. tropicalis* e 43 (27%) outras espécies do gênero *Candida*.

No Brasil, vários investigadores têm descrito a epidemiologia da candidemia em hospitais terciários. A taxa de incidência de candidemia continua a ser elevada, com taxas de

incidência variando 1,27-2,49 por 1.000 admissões. Entretanto, estudos realizados em hospitais terciários, nos Estados Unidos e vários países europeus têm mostrado taxas de incidência mais baixas, variando 0,28-0,96 e 0,02-1,08 por 1.000 internações, respectivamente (WILLE *et al.*, 2013).

Num estudo conduzido em diferentes unidades hospitalares (Unifesp/ EPM, Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná e Hospital Pequeno Príncipe e Hospital Universitário Clementino Fraga Filho) por um período de dois anos mostraram que as infecções por *C. albicans* ainda continuam sendo as mais frequentes (40.5%), mas outras espécies de *Candida* corresponderam a 63,3% dos isolados, incluindo predominantemente *C. parapsilosis* (25.8%), *C. tropicalis* (13.2%), *C. glabrata* (10.0%) e *C. guilliermondii* (1.6%) (NUCCI *et al.*, 2013).

Recentemente, Wille e colaboradores (2013) realizaram um estudo em um hospital terciário em São Paulo no período de 1994-2004, onde identificaram que a maioria dos episódios de candidemia (388) foram causadas por *C. albicans* (42,5%), *C. tropicalis* (27,3%), *C. parapsilosis* (21,9%), *C. glabrata* (4,4%), *C. guilliermondii* (1,5%), *C. krusei* (1%), *C. peliculosa* (0,3%) e outros (1%).

No Nordeste do Brasil, em um hospital terciário em Recife detectou-se que a taxa de incidência de candidemia foi de 3,9 episódios por 1.000 admissões. Espécies não-*albicans* representaram mais de 50% dos casos, predominando *C. parapsilosis* (33%) e *C. tropicalis* (24%) (HINRICHSEN *et al.*, 2008).

No contexto do Estado do Ceará, Medrano e colaboradores (2006) realizaram um estudo em um hospital na cidade de Fortaleza, onde foram analisadas 50 hemoculturas de 40 pacientes com quadros de candidemia. As espécies mais frequentes foram *C. parapsilosis* com 36%, seguida por *C. albicans* com 28%, *C. tropicalis* 16%, *C. guilliermondii* 12%, *C. glabrata* 4% e *Candida spp.* 4%.

Corroboram com esses dados, um estudo realizado por Freitas (2014) na qual foi realizado um levantamento na Coleção de Leveduras do LABEL/FF/UFC um total 164 cepas de *Candida* as quais 35,3% eram *C. albicans*, 39% *C. tropicalis*, 21,9% *C. parapsilosis* e 3,6% *C. glabrata*, oriundas de diversos materiais biológicos: sangue e urina, seguidas por líquido peritonal, lavado gástrico e lavado broncoalveolar.

A epidemiologia das infecções fúngicas invasivas (IFIs) está mudando, *Candida albicans* continua sendo a levedura mais importante, no entanto, um notável crescimento de infecções por espécies não *albicans* (*C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*)

tem aumentado e corresponde a 36-63% de todos os casos (HORN, *et al.*, 2009; GAMARRA, 2010; CHI, *et al.*, 2011).

2.3 Epidemiologia das criptococoses

A criptococose é uma micose de distribuição cosmopolita de caráter oportunista, causada por espécies de *Cryptococcus* (*Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*) e a grande maioria dos pacientes com infecção sintomática disseminada tem uma condição subjacente identificada, são imunocomprometidos (DEL POETA; CASADEVALL, 2011).

Em estudo realizado por Cogliati (2013), onde o mesmo analisou todas as informações disponíveis na literatura mundial sobre o isolamento das duas espécies de *Cryptococcus* (*C. neoformans* e *C. gattii*) em todos os continentes, foi evidenciado que na Oceania, de um total de 2.518 espécies isoladas de *Cryptococcus* foram relatados a partir de quatro países: Austrália, Nova Zelândia, Papua Nova Guiné, e Ilhas do Hawaii. No qual 1.328 isolados foram de *C. gattii*, 900 isolados de *C. neoformans* e 290 isolados classificados como espécies de *Cryptococcus* complexo.

No continente asiático, as análises combinadas entre China, Índia e Tailândia, contribui principalmente para o estudo relatando 80% dos isolados asiáticos, *C. neoformans* foi a espécie predominantemente isolada na Ásia (n = 5,192), sendo *C. gattii* cerca de dez vezes menos frequente (n= 682) (COGLIATI, 2013).

Segundo Dou (2015) em um estudo realizado entre 2007 e 2013, em diferentes pacientes de centro médicos de Pequim na China, foram detectados 83 isolados de *C. neoformans*, frente a 76 isolados clínicos de pacientes.

Na Europa, a maioria dos isolados foram relatados a partir de França, Espanha, Itália e Reino Unido que representa 82% do total (n= 8,736). Um total de 6.371 isolados foram identificados como *C. neoformans* e 94 como *C. Gattii* (COGLIATI, 2013).

No continente americano, mais especificamente na América Do Norte, um total de 7.922 *C. neoformans* e *C. gatti* isolados foram relatados dos EUA (79%), Canadá (15%) e México (6%). Na América do Sul e Central, dentre as 10.548 espécies de *Cryptococcus* isolados, 53% foram relatadas no Brasil, 22% da Colômbia, 15% da Argentina, e uma menor percentagem de outros países (COGLIATI, 2013).

Corroboram com esse estudo dados da Associação Argentina de Microbiologia (2015), onde no período de 2008 a 2013 na cidade de Resistencia, na província de Chaco foram identificados 26 novos casos de criptococose, pacientes HIV positivos foram 18 (69,2%).

Entre o HIV negativo foram 8 (30,7%), as condições eram diabetes mellitus, lúpus eritematosos sistêmicos e outras imunossupressões. Desses achados, todos foram identificados por *C. neoformans*.

Entre agosto de 2010 e julho de 2013, casos clínicos de 27 *Cryptococcus* spp. foram isolados de pacientes internados em hospitais universitários de Cuiabá. Entre os 27 pacientes com diagnóstico de criptococose no período do estudo, quatorze pacientes eram HIV positivos, com 13 isolados que apresentaram *C. neoformans*. Treze pacientes com sorologia HIV negativa, três foram identificados com *C. neoformans*. *Cryptococcus neoformans* foi o isolado mais prevalente entre os indivíduos infectados pelo HIV (FAVALESSA, 2014).

Foram analisados 42 prontuários de pacientes com criptococose do Hospital Conceição, do Grupo Hospitalar Conceição, na cidade de Porto Alegre - Rio Grande do Sul (Brasil), durante o período de junho de 2011 a julho de 2013. Desses 42 prontuários, vinte e sete (64%) informavam o diagnóstico laboratorial de *Cryptococcus neoformans*, entretanto, 15 prontuários (36%) não especificavam a espécie da amostra. Diante análise da condição imunológica dos pacientes, foi constatado predominância de pacientes com SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), 40 pacientes (95%) (MEZZARI, 2013).

Em um estudo realizado por Martins e colaboradores (2011), 63 isolados de criptococose foram identificados em pacientes diagnosticados entre 2008-2010, em Teresina. Dos 63 pacientes, 37 (58,7%) eram HIV positivo e 26 (41,3%) eram HIV negativo. Análises identificaram 37/63 (58,7%) dos isolados como *C. neoformans*, predominantemente em pacientes HIV positivos (32/37, 86,5%).

Corroboram com o mesmo, um estudo realizado por Perdigão Neto (2011), onde após realizar uma pesquisa por entidade nosológicas (prontuários no Serviço de Arquivo Médico e Estatística – SAME do Hospital São José e no SAME da Secretaria de Saúde do Estado de Ceará), foram encontrados registros de 139 pacientes que foram diagnosticados com criptococose, entre janeiro de 1985 a julho de 2010, com sorologia para HIV positiva para 52 pacientes e negativa para 26 pessoas, contudo, nem todos esses pacientes foram submetidos a sorologia para HIV.

2.4 Arsenal farmacológico para o tratamento antifúngico

O número de drogas antifúngicas disponíveis atualmente para o tratamento da candidíase é limitado. Os agentes terapêuticos podem ser divididos principalmente em dois grupos: o primeiro, os agentes antifúngicos que ocorrem naturalmente, tais como os polienos

e as equinocandinas, e o segundo, os fármacos sintéticos, incluindo os azóis e as pirimidinas fluoradas (RANG *et al.*, 2007).

A quantidade de agentes antifúngicos clínicos disponíveis é limitada, em contraste com os fármacos antibacterianos. Isto pode ser atribuído a vários fatores, incluindo os problemas inerentes na identificação de um agente eficaz que atue sobre a célula eucariótica fúngica, sem ser tóxico para as células hospedeiras (MUNÓZ *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2012).

Um fator primordial no tratamento das micoses é eliminar os fatores predisponentes, fato que por vezes não é possível, como em doenças como câncer, leucemia, linfoma, AIDS e diabetes. Tendo em vista a crescente resistência que os fungos adquirem aos agentes terapêuticos, a realização de testes de sensibilidade é muito importante, e devem ser realizados, se possível, antes do início do tratamento (LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010).

A escolha do agente terapêutico ideal, bem como sua formulação, é determinada a partir do quadro clínico desenvolvido pelo paciente, juntamente com a susceptibilidade do agente causador, a existência de medicamentos de uso endovenoso e oral, interações medicamentosas e o custo do tratamento (MARTINEZ, 2006).

2.4.1 Poliênicos

Os poliênicos pertencem a uma classe de compostos naturais com uma molécula anfipática heterocíclica. Eles têm como alvo o ergosterol (componente essencial para a membrana citoplasmática fúngica) da membrana dos fungos através da inserção nas bicamadas lipídicas criando poros que rompem a integridade da membrana plasmática, o que permite pequenas moléculas se difundirem através da membrana, resultando em morte de células (PEMAN, 2009; CHANDRASEKAR, 2011).

Existem dois principais poliênicos: anfotericina B e nistatina. Anfotericina B ainda é considerada o padrão ouro no tratamento da maior parte das infecções fúngicas, especialmente em infecções invasivas graves. No entanto, a anfotericina é tóxica para células de mamíferos, particularmente provocando a nefrotoxicidade. Para ultrapassar a toxicidade de uma variedade de versões reformuladas foram introduzidas formulações lipídicas de anfotericina B, que são melhores toleradas do que a anfotericina B desoxicolato (WINGARD *et al.*, 2000)

Na América Latina, a anfotericina B desoxicolato continua a ser o antifúngico mais utilizado, seguido do fluconazol. Equinocandinas e outras formulações de anfotericina B são

raramente utilizadas devido ao seu custo mais elevado (SIFUENTES-OSORNIO; CORZO-LEON; PONCE-DE-LEON, 2012).

Apesar de ter um largo espectro de atividade contra a maioria dos fungos, as formulações de lipídios são muito caras, o que limita a utilização de segunda linha ou terapia de salvamento (QUINTA; MORAIS, 2012).

2.4.2 Triazólicos

Os triazólicos são a maior classe de drogas antifúngicas no uso clínico e foram implantadas durante cerca de duas décadas. Os antifúngicos triazólicos bloqueiam etapas importantes da biossíntese do ergosterol da célula fúngica, o mecanismo molecular é a inibição da enzima citocromo p450 14- α -demetilase, essa inibição resulta em um aumento da permeabilidade celular com consequente inibição do crescimento e reprodução (WARRILOW *et al.*, 2010).

Os triazólicos incluem o fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. Dada a seu excelente perfil de segurança e baixo custo e a eficácia comprovada para o tratamento de candidíase invasiva, o fluconazol continua a ser um dos agentes antifúngicos mais comumente utilizados (MEYER, 2007).

O voriconazol é uma segunda geração de triazólicos que é ativo contra todas as espécies de *Candida* e tem um amplo espectro de atividade e, como o itraconazol, é fungicida contra alguns isolados de espécies filamentosos (ESPINEL-INGROFF, 2010). Posaconazol difere em estrutura dos triazólicos (fluconazol e voriconazol), em parte por sua cadeia lateral estendida (uma característica mantida em comum com itraconazol) (XIAO, 2004; NAGAPPAN; DERESINSKI, 2007).

As diferenças estruturais entre os triazólicos podem parecer pequenas, mas eles ditam a sua potência antifúngica e espectro, biodisponibilidade, interação medicamentosa e potencial tóxico. Posaconazol está atualmente disponível apenas como suspensão oral e deve ser tomado com alimentos ou um suplemento nutricional, um pouco limitante a sua utilidade. O fármaco é bem tolerado, com um perfil de segurança global comparável ao do fluconazol (NAGAPPAN; DERESINSKI, 2007).

2.4.3 Equinocandinas

As equinocandinas constituem a mais nova classe de fármacos antifúngicos aprovados pela FDA para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas. Os principais constituintes deste grupo são: caspofungina, micafungina e anidulafungina.

Seu mecanismo de ação está relacionado com a inibição da β -1,3-glucana sintase, uma enzima que é necessária para a síntese de β -1,3-D-glucano, um componente essencial da parede celular de vários fungos. Essa inativação faz com que a parede celular se rompa, resultando em instabilidade e morte celular. Por se tratar de um alvo que não é encontrado em células de mamíferos, os efeitos adversos são mínimos. Possuem um espectro de ação limitado quando comparado aos azólicos. No entanto, são excelentes agentes para o tratamento da candidíase. (BAL, 2010; PFALLER et al., 2011; KATHIRAVAN et al. 2012).

2.5 Resistência ao fluconazol

A resistência às drogas antifúngicas é um fenômeno cada vez mais reconhecido e pode ser clinicamente definido como a persistência de sinais e sintomas da infecção, apesar da presença de um tolerável nível da droga. Dependendo do fármaco e da espécie de *Candida*, o mecanismo de resistência antifúngica pode ser inerente (presente, sem exposição prévia ao antifúngico) ou adquirida, em que a resistência desenvolve-se em um organismo previamente susceptível, após um período de exposição ao agente (SILVA *et al.*, 2012).

Os relatos de resistência aos azólicos têm uma posição de liderança em publicações. O uso excessivo de azólicos (especialmente fluconazol) em tratamentos de pacientes HIV-positivos com infecções fúngicas nas mucosas no período anterior à introdução da terapia antiretroviral tem favorecido a aquisição de resistência aos azólicos de vários fungos patogênicos (KOTHAVADE *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2013).

Os principais mecanismos de resistência aos antifúngicos azólicos pelos quais os fungos de importância médica têm sido estudados são: (i) desenvolvimento de vias de desvio na biossíntese dos esteróis (ii) a super expressão do gene *ERG11*, também conhecido como *CYP51*, que codifica a enzima alvo lanosterol 14- α -demetilase, (iii) as mutações em *ERG11* que resultam na redução da susceptibilidade da lanosterol 14- α -dimetilase (*Erg11p*) à inibição pelos azólicos, e (iv) alteração nas bombas de efluxo pela superexpressão dos genes *CDR* ou *MDR*, o que leva a diminuição da concentração do fármaco dentro da célula fúngica (GAST et

al., 2013). Estes mecanismos podem ser encontrados separadamente, mas eles também podem ser combinados, contribuindo assim para a aquisição de resistência aos azólicos (TOBUDIC, KRATZER; PRESTERL, 2012; SANGLARD *et al.*, 2003).

Coincidindo com a ocorrência de isolados resistentes a azólicos, muitos esforços foram realizados para solucionar esse problema: (i) a procura de novos antifúngicos, tais como o posaconazol e o ravuconazol, (ii) o desenvolvimento de novas formulações dos agentes estabelecidos, tais como o itraconazol (ITC), através de uma formulação intravenosa que superou os erros de biodisponibilidade da formulação oral de cápsula e (iii) a melhoria da eficácia de antifúngicos usando a terapia de combinação, por exemplo, combinar agentes antifúngicos com diferentes mecanismos ou a combinação de agentes antifúngicos e não antifúngicos (GUO *et al.*, 2008).

O aumento da disponibilidade de compostos antifúngicos tem motivado a busca de melhores estratégias terapêuticas, tais como a utilização de novos agentes antifúngicos em combinação. A utilização desses compostos em associação visa à obtenção de um efeito sinérgico em que o resultado desta associação é superior ao previsto com base na adição dos efeitos individuais de cada droga. A terapia da combinação pode ser utilizada na tentativa de prevenir ou retardar o aparecimento de populações resistentes do fungo patogênico (ESTRELLA, 2004).

2.6 Testes de susceptibilidade aos fármacos antifúngicos

O aparecimento de cepas resistentes, o surgimento de novas drogas e a ocorrência de falhas no tratamento das infecções fúngicas invasivas levaram ao desenvolvimento de métodos para a investigação da sensibilidade *in vitro* aos antifúngicos (ARIKAN, 2007; SANGLARD & ODDS, 2002). A maioria desses métodos emprega técnicas de microdiluição em caldo e está baseada no cálculo da concentração inibitória mínima (CIM) estimado pela determinação do percentual de inibição em relação a um controle de crescimento (CUENCA-ESTRELLA & RODRÍGUEZ-TUDELA, 2002).

O Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) anteriormente conhecido como National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) desenvolveu método de referência, reconhecido como teste padrão de referência (Norma M27-A3) utilizando testes de microdiluição em caldo para determinar a suscetibilidade *in vitro* de leveduras frente a agentes antifúngicos, com proposta de leitura visual ou espectrofotométrica e tempo de incubação de 24 a 48 horas para o gênero *Candida* e de 48 horas para o gênero *Cryptococcus*,

e incluem pontos de corte para as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina e micafungina) e para o voriconazol. Este documento facilita a comparação de resultados entre diferentes laboratórios na determinação da suscetibilidade de leveduras (CLSI, 2008).

O Antifungal Susceptibility testing Sub-committee of the European on Antimicrobial Susceptibility Testing (AFST-EUCAST) desenvolveu protocolo baseado na primeira edição do documento do NCCLS M27 – A, introduzindo modificações tais como o aumento da quantidade do inóculo (cem vezes maior em relação ao método NCCLS/CLSI) e incremento da concentração final de D-glicose para 2% (dez vezes maior que o método NCCLS/CLSI) com o objetivo de alcançar a leitura do ponto de corte em 24 horas. Sucessivos estudos realizados demonstraram bons resultados na análise comparativa interlaboratorial utilizando esta metodologia (VALE-SILVA & BUCHTA, 2006).

Para interpretar a concentração inibitória mínima (CIM) do fluconazol nos estudos de sensibilidade de leveduras o CLSI propõe pontos de cortes de $\leq 2 \mu\text{g/mL}$ para as cepas sensíveis, $4 \mu\text{g/mL}$ para as cepas dose-dependente e $\geq 8 \mu\text{g/mL}$ para cepas resistentes (CLSI, 2012). Os membros do EUCAST, com isso propõe outros pontos de corte de acordo com a análise da população e o comportamento clínico dos antifúngicos, recomendando para estirpes sensíveis de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* $\leq 2 \text{ mg/L}$, a dose estirpes dependentes de 4 mg/L e para resistente $> 4 \text{ mg/L}$ estirpes (RODRIGUEZ-TUDELA *et al.*, 2008).

A microdiluição em caldo segundo o documento M27-A3 é o método de referência padronizado pelo CLSI para testar a sensibilidade aos antifúngicos de leveduras que causam infecções invasivas, como *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* (CLSI, 2008).

2.7 Importância dos recursos naturais como possíveis fontes de obtenção de novos fármacos

Moléculas bioativas, que foram obtidas a partir de diversos recursos naturais, incluindo micróbios terrestres e marinhos, plantas e animais (invertebrados e vertebrados) e seus derivados, foram validados por suas potenciais propriedades antifúngicas. Essas moléculas ainda podem apresentar atividade anticancerígena, anticoagulante, antiparasitária e imunossupressora. Esses compostos antibióticos por serem não tóxicos ou menos tóxicos para as células hospedeiras apresentam um papel vital no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 80% da população mundial usa medicamentos tradicionais para tratar doenças infecciosas e não infecciosas, e a

maioria são oriundas de plantas e/ou seus produtos. Compostos tais como alcalóides, taninos, flavonóides, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, ácidos fenólicos e os óleos essenciais normalmente apresentam atividade contra *C. albicans*, incluindo espécies emergentes de *Candida* não *albicans* (DURAI PANDIYAN *et al.*, 2006; RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012).

Os produtos naturais oriundos de plantas têm atraído interesse científico mais recentemente, por suas propriedades antifúngicas (CAVALEIRO *et al.*, 2006; PARK *et al.*, 2011). A pesquisa neste campo pode conduzir ao desenvolvimento de drogas efetivas contra fungos patogênicos (MONDELLO *et al.*, 2006). Porém, os produtos naturais apresentam problemas relacionados às suas características físico-químicas implicando em parâmetros farmacocinéticos deficientes. Além disso, a obtenção de grandes quantidades de um produto de origem natural inviabiliza o seu uso como fármaco. Em decorrência disso, a semi-síntese surgiu como uma ferramenta para promover modificações estruturais a fim de modular as propriedades biológicas destes produtos puramente naturais (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Compostos tais como alcalóides, taninos, flavonóides, proteínas, peptídeos, glicoproteínas, ácidos fenólicos e os óleos essenciais normalmente apresentam atividade contra *C. albicans*, incluindo espécies emergentes de *Candida* não *albicans* (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012).

2.8 Compostos de plantas com atividade antifúngica

Neste contexto, novos agentes antifúngicos a partir de produtos naturais podem ser alternativas úteis para o tratamento de doenças fúngicas, porque eles têm a vantagem de possuírem menos efeitos colaterais e podem contribuir para a redução da resistência antifúngica. Recentemente, existe um interesse crescente na utilização de plantas medicinais e seus compostos no tratamento de algumas doenças (PARK *et al.*, 2011).

Há muito tempo os produtos de origem natural são utilizados no mundo inteiro pela terapêutica alternativa. Estima-se que as comunidades locais utilizam cerca de 10% das plantas nativas com fins terapêuticos. Entretanto, apenas 1% dos produtos utilizados ganha reconhecimento científico (KHAN *et al.*, 2008).

As plantas constituem uma das mais importantes fontes de drogas com potencial medicinal, e podem contribuir efetivamente para a busca de novos produtos bioativos. A diversidade molecular de produtos de origem vegetal é muito superior aos produtos obtidos através de síntese, proporcionando uma maior possibilidade de elaboração de novos fármacos

com funções terapêuticas diversificadas (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2007; USTULIN *et al.*, 2009).

Adicionalmente, recursos naturais, como plantas, micróbios, tais como bactérias, fungos, microalgas e invertebrados, estão oferecendo moléculas com potencial bioativo como cura para vários tipos de doenças. Assim, essas moléculas geram condições potenciais para o desenvolvimento de drogas antifúngicas com atividade anticandida eficaz, mínimos efeitos colaterais e tolerância suficiente pelo paciente (RAJESHKUMAR; SUNDARARAMAN, 2012).

Os fungos são um grupo de organismos extremamente diversificados, com cerca de 250 mil espécies amplamente distribuídas em essencialmente todos os ecossistemas. Felizmente, apenas 200 ou mais espécies são patogênicas para mamíferos, embora muitos fungos não patogênicos possam causar sintomas de alergia (SELITRENNIKOFF *et al.*, 2001). As infecções fúngicas podem ser devastadoras com um sério efeito sobre a saúde ou levar a enormes perdas econômicas. Os organismos vivos têm a capacidade inata para combater invasões fúngicas através da produção de proteínas antifúngicas. Dentro deste contexto as plantas merecem um destaque especial (WONG *et al.*, 2010).

Observa-se um crescente interesse com relação aos fitomedicamentos, visto que esses apresentam diversas vantagens, quando comparados com os agentes terapêuticos convencionais, como a menor incidência de efeitos colaterais, toxicidade relativamente diminuída, baixo custo e no fato do Brasil ser um país com uma imensa biodiversidade. Pesquisas realizadas nas universidades brasileiras já identificaram mais de 350 mil espécies vegetais, mostrando que há um grande potencial de produtos naturais que podem ser destinados a uso medicinal (MARTINS, 2009). Diversos estudos apontam que compostos vegetais têm atividade antifúngica contra alguns agentes patogênicos humanos, tais como *C. albicans* (AERTS *et al.*, 2009; SEMIGLAZOV *et al.*, 2006).

Recentemente os produtos naturais oriundos de plantas têm atraído interesse científico por suas propriedades antifúngicas. A pesquisa neste campo pode conduzir ao desenvolvimento de drogas efetivas contra fungos patogênicos (PARK *et al.*, 2011).

2.9 Curcumina

A *Curcuma Longa* L. é uma planta nativa do sudeste Ásia. No Brasil é conhecida popularmente como curcumina, cúrcuma, batatinha-amarela, gengibre-dourado, mangarataia,

açafrão-da-índia ou açafrão-da-terra. A planta tem boa produção em regiões tropicais, seu cultivo no Brasil está centralizado principalmente nos Estados de Goiás, Mato Grosso e São Paulo (ROSA, 2009).

Muitas substâncias estão em estudo para o tratamento das candidemias e, entre estas, é possível destacar a curcumina [1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona] (Figuras 2), um polifenol amarelo extraído do rizoma da *Curcuma longa* (Figura 1), uma planta tropical do Sudeste da Ásia (BISHT *et al.*, 2007) pertencente à família *Zingiberaceae* (ARAÚJO e LEON, 2001).

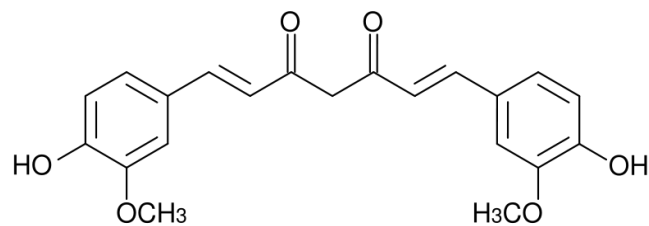


Figura 1: Estrutura química da curcumina

Fonte: autor

Algumas propriedades terapêuticas da curcumina já são bem descritas, dentre elas o seu potencial terapêutico com ação anti-inflamatória, anticarcinogênico, anti-infecciosas, antidiabética, antioxidante, antibiótica, antiviral, antiparasitária (PINTÃO, 2008). Como também são bem documentados no tratamento de problemas respiratórios como asma, alergia, problemas de fígado, anorexia, reumatismo, diabetes e sinusite (SHAIKH *et al.*, 2009). Também, em várias doenças crônicas que apresentam inflamação, a curcumina apresentou potencial terapêutico, entre elas, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla, epilepsia, problemas cerebrais, psoríase, colite e AIDS (AGGARWAL e HARIKUMAR, 2009).

A curcumina é um poderoso antioxidante que influencia a expressão de enzimas relacionados como os processos redox, tais como a glutationa-sintetase (GTS) e citocromo P450 oxidase (CYP-450), capazes de neutralizar espécies reativas de oxigênio. (GRYNKIEWICZ e SLIFIRSKI, 2012; WITKIN e LI, 2013).

Em um estudo realizado por Chandram e Goel (2012) com pacientes que sofrem de artrite reumatóide, o tratamento com dose de 500 mg por dia de curcumina reduziu os níveis inflamatórios significativamente sem causar efeitos adversos.

Também possui efeitos anticancerígenos, sendo capaz de reduzir o crescimento de tumores e problemas secundários relacionados ao câncer, como fadiga, depressão e insônia

(WITKIN e LI, 2013). A curcumina inibe direta e indiretamente a ciclooxigenase-2 (COX-2), proteína crucial na cascata de inflamação. Em células cancerígenas, a curcumina mostra uma capacidade anti-inflamatória e uma redução do crescimento celular inibindo a expressão de interleucinas IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (TAYLOR e LEONARD, 2011).

A curcumina tem um papel fundamental na proteção gastrointestinal: se tem visto que a curcumina inibe a ativação de vários fatores de transcrição que desempenham um papel chave na inflamação dos intestinos, tais como o fator nuclear kappa- β (NF-k β) e as β -catequinas. (TAYLOR e LEONARD, 2011). Ele tem sido usado desde os tempos antigos contra gastrite ou azia porque ajuda a aumentar a produção de muco e protege o revestimento do estômago. Também estimula o fluxo biliar para o intestino, melhorando a digestão de gorduras dietéticas.

Também mostrou que a curcumina pode evitar o acúmulo de placas de beta-amilóide, que se correlacionam com a doença de Alzheimer (WITKIN e LI, 2013). Estudos *in vivo* mostram a capacidade da curcumina para reduzir o estresse, melhorar a irritabilidade e ansiedade, modular a depressão e mecanismos de neurotransmissão modificando o sinal celular (HISHIKAWA *et al.*, 2012; WITKIN e LI, 2013).

Curcumina tem uma poderosa ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, vírus e fungos. O desenvolvimento de linhagens resistentes entre as espécies de *Candida* contra drogas antifúngicas existentes tornou-se um problema crítico para estratégias terapêuticas, assim encontrar novas substâncias anti-*Candida* parece ser crucial (JIANHUA e HAI, 2009).

A falta de compostos antifúngicos com poucos efeitos colaterais reforça a importância de estudar os produtos naturais para esta finalidade. A atividade antifúngica é outro importante efeito biológico da curcumina, em especial frente à *Candida* spp (KHAN *et al.*, 2012; MARTINS *et al.*, 2009).

Um estudo da curcumina contra 14 cepas de *Candida* incluindo quatro estirpes ATCC e 10 isolados clínicos mostraram que a curcumina é um composto fungicida potente contra espécies de *Candida* com valores de CIM variando entre 250 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ (NEELOFAR *et al.*, 2011).

Em outro estudo, a atividade antifúngica da curcumina foi demonstrada contra 38 diferentes cepas de *Candida*, incluindo algumas estirpes resistentes ao fluconazol e isolados clínicos de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondii*. Os valores de

MIC₉₀ para as estirpes sensíveis e resistentes foram 250-650 e 250-500 µg/mL respectivamente (KHAN, SHREAZ e BHATIA, 2012).

Em experimento realizado por Jianhua e Hai (2009), a curcumina foi testada em cepas de *C. albicans* para a verificação da ação deste polifenol na inibição do crescimento das cepas, comprovando-se a existência deste efeito na utilização de diferentes concentrações de curcumina.

A curcumina isolada inibiu o crescimento de *Candida albicans*, enquanto o ácido ascórbico isolado não apresentou efeito. No entanto, quando a associação de ácido ascórbico e curcumina foi testada a concentração inibitória mínima diminuiu de 5 a 10 vezes. Nos ensaios de antioxidantes, as atividades do ácido ascórbico e da curcumina separados foram menores que a atividade da mistura dos dois compostos (KHALIL *et al.*, 2012).

Uma das principais complicações durante terapias contra a asma crônica é candidíase orofaríngea. A curcumina como um candidato em potencial para o tratamento de candidose com atividade anti-inflamatória foi estudado num modelo murino de asma. Administrado por via oral a curcumina é mais eficaz do que a dexametasona para reduzir a carga fúngica em ratos BALB/c. E também diminuiu significativamente alterações patológicas na asma (KARAMAN, ARIKAN AYYILDIZ e FIRINCI, 2011).

A adesão das espécies de *Candida* isoladas a partir de pacientes com SIDA a células epiteliais bucais também é marcadamente inibida por curcumina e verificou-se ser mais eficaz em comparação com o fluconazol (MARTINS *et al.*, 2009).

3. HIPÓTESES

A curcumina apresenta atividade *in vitro* frente à *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol. A curcumina promove danos ao DNA de cepas de *Candida spp.* resistentes ao fluconazol.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito, *in vitro*, da curcumina frente a cepas de *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol.

4.2. Objetivos Específicos

4.2.1. Identificar as cepas de *Candida spp.* e *Cryptococcus neoformans* pertencentes à micoteca do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL) da Universidade Federal do Ceará.

4.2.2. Determinar o potencial antifúngico, *in vitro*, da curcumina frente as 13 cepas de leveduras patogênicas (*Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*) resistentes ao fluconazol.

4.2.3. Investigar o possível mecanismo de ação da curcumina através de citometria de fluxo e o teste do cometa – versão alcalina.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Drogas e micro-organismos

Fluconazol, Anfotericina B e a Curcumina foram obtidos comercialmente (Sigma Chemical Co, USA). Os demais reagentes foram de grau analítico. Para este estudo, foram utilizadas três cepas de *C. albicans*, três cepas de *C. parapsilosis*, três cepas de *C. tropicalis* e 4 cepas de *Cryptococcus neoformans*, todas isoladas de sangue, disponibilizadas pelo Laboratório Central de saúde pública do estado do Ceará (LACEN), as quais fazem parte da Coleção de Leveduras do Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras (LABEL/UFC). As cepas foram inoculadas em ágar Sabouraud dextrose (Himedia Mumbai-Índia) e incubadas a 37°C/24 h. Em seguida foram semeadas em CHROMagar Candida (Himedia Mumbai-Índia) para avaliar a pureza (DA SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.2 Identificação Molecular das leveduras

O DNA genômico foi purificado utilizando um protocolo baseado no método CTAB, tal como descrito anteriormente por (WARNER et al.,1996). A região de DNA nuclear foi amplificada pela reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers ITS4 e ITS5, tal como sugerido por (WHITE et al.,1990). Uma vez que a especificidade das amplificações for confirmada, os produtos da PCR foram purificados utilizando-se kits de purificação (SAMBROOK, 1989). O sequenciamento do DNA foi realizado utilizando o DYEnamic ET terminators cycle sequencing kit (GE Health care Bio-Sciences) e as cadeias foram sequenciadas utilizando os iniciadores ITS4 e ITS5. As reações de sequenciamento foram analisadas no sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE HealthcareBio-Sciences). As sequências de bases foram deduzidas a partir dos eletroferogramas e as sequências completas foram montadas utilizando o software Cap3 (HUANG et al.,1999). As sequências determinadas foram comparadas com aquelas previamente depositadas na base de dados GenBank utilizando o programa BLAST (ALTSCHUL et al.,1990).

5.3 Testes de sensibilidade antifúngica

O teste sensibilidade a antifúngicos de microdiluição em caldo (MCC) foi realizado de acordo com documento M27-A3 (CLSI, 2008) utilizando RPMI (pH 7,0) tamponado com

0,165 M ácido morfolinopropano sulfônico (MOPS; Sigma Chemical Co). O fluconazol (FLC) foi dissolvido em água destilada e a curcumina foi dissolvida em dimetil sulfóxido, o mesmo foi usado como controle negativo, na faixa de 0.039 – 10% v/v (DMSO; Sigma Chemical Co). Ambos foram testados na faixa de 64 - 0.125 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h, e os resultados foram lidos visualmente, tal como recomendado pelo CLSI. Para o fluconazol e a curcumina, o CIM (concentração inibitória mínima) foi considerado como a concentração que inibe 50% do crescimento fúngico. A atividade *in vitro* do fluconazol foi avaliada de acordo com o valor do CIM. As cepas de *Cryptococcus neoformans* foram consideradas como sensível (S), dose-dependente (SDD), e resistentes (R). Os pontos de corte usados para o fluconazol foram: as cepas com CIM ≤ 8µg/mL (S), 16 µg/mL (SDD), e ≥ 64µg/mL (R). As cepas de *Candida* spp. foram consideradas como sensível (S), dose-dependente (SDD), e resistentes (R). Os pontos de corte usados para o fluconazol foram: as cepas com CIM ≤ 2µg/mL (S), 4 µg/mL (SDD), e ≥ 8µg/mL (R). Foram utilizadas 2 cepas como controle, ATCC *C. Parapsilosis* e ATCC *C.krusei* (CLSI, 2012).

5.4 Preparação da suspensão

Uma única e representativa cepa de *C. albicans*, foi utilizada para os ensaios posteriores. As suspensões celulares foram preparadas a partir de culturas em fase de crescimento exponencial. As células foram colhidas, centrifugadas (1600g por 10 min a 4°C) e lavadas duas vezes com uma solução salina 0.85% (1200g por 5 min a 4°C), e então ressuspensas (~10⁶ células /mL) com tampão HEPES [N - (2-Hydroxyethyl) piperazine-N' - (2-ethanesulfonic acid)] suplementado com glicose 2%, pH 7.2 (DA SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.5 Tratamento das células de *C. albicans*

Para a determinação da integridade da membrana, avaliação do potencial transmembrana mitocondrial e marcação por anexina V, a cepa de *C. albicans* resistentes ao fluconazol foi exposta ao FLC (64 µg/mL), anfotericina B (Anfo B) (4 µg/mL), concentrações variadas de Curcumina (CIM, 2x CIM e 4x CIM) e em meio RPMI que foi utilizado como controle negativo. As células tratadas foram incubadas a 37° C durante 24 h. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes (DA

SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.6 Determinação do número de células viáveis e da integridade de membrana das células de *C. albicans*

A integridade de membrana de cepas de fungos foram avaliadas pelo método de exclusão com iodeto de propídio (2 ug/mL). A fluorescência celular foi então determinada usando o citômetro de fluxo GuavaEasyCyte™ Mini System (Guava Technologies, Inc., Industrial Blvd. Hayward, CA, USA) e o software CytoSoft 4.1 (DA SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.7 Avaliação do potencial de membrana ($\Delta\psi_m$) das células de *C. albicans*

O potencial transmembrana mitocondrial foi determinado pela retenção do marcador rodamina 123 pelas células de leveduras após a exposição aos tratamentos descritos anteriormente (**item 5.4 e 5.5**), por 24 h. As células foram lavadas com tampão fosfato salina (PBS), incubadas com rodamina 123 (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) a 37 ° C durante 15 min, na ausência de luz. Após esse tempo, lavou-se duas vezes com solução de PBS. As células foram então incubadas novamente em PBS a 37 ° C durante 30 min, no escuro, e a fluorescência foi então medida utilizando o citômetro de fluxo (GuavaEasyCyte™ Mini System). Dez mil eventos foram avaliados por experimento (n = 3) e os detritos de células foram omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; DA SILVA et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.8 Ensaio do cometa alcalino

O ensaio do cometa alcalino foi realizado conforme descrito por MILOSHEV et al (2002). 200 μL de agarose 0,5% (ponto de fusão normal) foram distribuídos sobre cada lâmina. Estas camadas de suporte de agarose foram, antes da aplicação da suspensão de células, secas ao ar. As células de levedura em suspensão (**item 5.4 e 5.5**) foram centrifugadas numa microcentrífuga Eppendorf durante 5 min. Foram lavadas com água destilada estéril e ressuspensas em tampão S (1M sorbitol, 25 mM de KH_2PO_4 , pH 6,5). Alíquotas de aproximadamente 5×10^4 células foram misturadas com de agarose 0,7 % (baixo ponto de

fusão) contendo 2 mg / ml de Zymolyase 20T (Seikagaku Corp., Japão) e foram espalhados sobre a camada de agarose. As lâminas foram então cobertas com lamínulas e foram incubadas durante 20 min a 30 ° C. Para minimizar a atividade de enzimas endógenas celulares, todos os procedimentos foram realizados em um ambiente com temperatura de 8-10 ° C. As lamínulas foram removidas e as lâminas foram incubadas em NaOH a 30 mM, NaCl 1 M, 0,1% laurilsarcosina, EDTA 50 mM (pH 12,3) durante 1 h. As lâminas foram lavadas três vezes com NaOH 30 mM e EDTA 10 mM (pH 12,4) por 20 minutos e depois foram submetidas a eletroforese (0,5 V / cm e 24 mA) durante 20 minutos no mesmo tampão. Após a eletroforese, as lâminas foram neutralizadas, submergindo-os em 10 mM de Tris-HCl (pH 7,5) durante 10 min, seguido de 10 min consecutivos incubações em etanol 76% e etanol a 96%, respectivamente. As lâminas foram deixadas a secar ao ar e foram então coradas com 1 mg / ml de brometo de etídio e visualizadas por microscopia de fluorescência. Todas as etapas acima foram realizadas no escuro, para evitar danos adicionais ao DNA. Foram analisadas as imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas) de cada grupo experimental. As células foram inspecionadas visualmente e classificadas em cinco classes (0-4) de acordo com os respectivos tamanhos das caudas (desde 0 = nenhum a 4 = danos extensos danos de DNA) e um valor de índice de dano foi calculada para cada amostra de células. Assim, o índice de dano variou de 0 (completamente intacta: 100 células x 0) a 400 (com dano máximo: 100 células x 4) (DA SILVA et al., 2013, ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.9. Análise da oxidação das bases purinas e pirimidinas do DNA de células de *C. albicans*.

O ensaio do cometa foi realizado como descrito acima, com algumas modificações. As lâminas foram removidas a partir de uma solução de lise e foram lavadas três vezes em tampão enzimático (HEPES 40 mM, KCl 100 mM, Na₂EDTA 0,5 mM, e 0,2 mg / mL de BSA, pH 8,0). Em seguida as lâminas foram secadas e incubadas com 70 µL de FPG (formamidopirimidina DNA-glicosilase) (New England Biolabs, EUA) durante 30 min a 37°C e ENDO III (endonuclease III) durante 45 min a 37 ° C (ambas as enzimas foram adquiridas de New England Biolabs, EUA). Foram analisadas as imagens de 100 células selecionadas aleatoriamente (50 células de cada uma das duas lâminas) de cada grupo experimental. A quantidade de bases purinas (sítios sensíveis FPG) e pirimidinas (sítios sensíveis ENDO-III) oxidadas foram determinadas pela subtração da quantidade de quebras nas cadeias observadas

no controle (amostras incubadas com tampão sozinho) do montante de quebras obtidas após incubação com as enzimas FPG ou ENDO III (DA SILVA et al., 2013, ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.10 Marcação por AnexinaV

As células tratadas e não tratadas de *C. albicans* foram coletadas por centrifugação e digeridas com 2 mg/mL Zymolyase 20T (Seikagaku Corporation, Japão) em tampão de fosfato de potássio (PPB, 1 M pH, sorbitol 6,0) durante 2 horas a 30 ° C. Os protoplastos de *C. albicans* foram marcadas com Anexina V e PI utilizando um kit de detecção de apoptose (Guava Nexin Kit, Guava Technologies, Inc., Hayward, CA, USA). Subsequentemente, as células foram lavadas com PPB e incubadas em tampão de ligação contendo 5µl de FITC-anexina V e 5 µl de PI por 20 min. As células foram depois analisadas no citômetro de fluxo (Guava EasyCyte™ Mini System). Para cada experimento (n = 3), 10.000 eventos foram avaliados, e os restos celulares foram omitidos da análise (DA SILVA et al., 2013; ANDRADE NETO et al., 2014; ANDRADE NETO et al., 2015).

5.11 Análise estatística

Os testes de sensibilidade *in vitro* foram feitos em triplicata em diferentes dias. As médias geométricas foram usadas estatisticamente para comparar os resultados do CIM. Os dados obtidos pelos experimentos de citometria de fluxo e ensaio do cometa alcalino foram comparados por meio da análise de variância (ANOVA) seguidos pelo teste do Newman-Keuls ($p < 0,05$).

6. RESULTADOS

6.1 Atividade antifúngica do composto Curcumina frente a cepas de leveduras patogênicas resistentes ao fluconazol

A sensibilidade de cada cepa ao fluconazol foi avaliada usando o método de microdiluição em caldo (MCC). De acordo com a tabela 1 (ver página 39), após 24 horas de exposição ao fluconazol, todas as cepas testadas apresentaram CIMs entre 8 e 32 $\mu\text{g/mL}$, confirmando assim a sua resistência. Todas as cepas estudadas foram inibidas pela curcumina, com diferentes graus de inibição entre as espécies. A tabela 1 mostra uma potencial atividade antimicrobiana contra os isolados clínicos de leveduras, com CIMs variando entre 8-64 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados demonstraram serem promissores, portanto, decidimos investigar o possível mecanismo de ação desta molécula em uma única cepa representativa de *Candida albicans*, utilizando técnicas de citometria de fluxo.

6.2 Perda da viabilidade celular e danos na membrana plasmática da cepa de *Candida albicans* tratadas com o composto curcumina

A Figura 2 demonstra que não houve redução significativa no número de células quando as mesmas foram tratadas com o FLC, o que evidencia uma eventual resistência do tratamento com o azólico. A análise por citometria de fluxo demonstrou uma significativa redução no número de células viáveis após as diferentes concentrações (CIM, 2x CIM e 4x CIM) de curcumina testadas, conforme a Figura 2. No entanto, podemos afirmar que dentre as três concentrações testadas à concentração equivalente a “4x CIM” foi a que mais apresentou redução no número de células viáveis, quando comparada ao controle ($p < 0,05$).

A Figura 3 revela que a estirpe resistente ao fluconazol não exibiu perda da integridade da membrana plasmática após exposição de 24 horas ao FLC quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). No entanto, a mesma figura evidencia que na presença do marcador iodeto de propídio (PI) parte das células tornaram-se PI-positivas quando tratadas com a curcumina após 24 h de exposição quando comparadas ao grupo controle ($p < 0,05$). A Figura 3 mostra que a curcumina causa danos à membrana celular de *C. albicans* resistente ao fluconazol.

Tabela1: Efeito antifúngico da Curcumina frente a cepas de leveduras isoladas de amostras clínicas.

Cepas ^a	CIM ^b		
	FLC	Curcumina	Nº GenBank
<i>C. albicans</i> 1	16 µg/mL	8 µg/mL	KJ740176
<i>C. albicans</i> 2	32 µg/mL	8 µg/mL	KJ740174
<i>C. albicans</i> 3	32 µg/mL	8 µg/mL	KJ740179
<i>C. parapsilosis</i> 1	32 µg/mL	8 µg/mL	KJ740186
<i>C. parapsilosis</i> 2	32 µg/mL	8 µg/mL	KJ740191
<i>C. parapsilosis</i> 3	32 µg/mL	8 µg/mL	KJ740188
<i>C. tropicalis</i> 1	16 µg/mL	16 µg/mL	KJ740185
<i>C. tropicalis</i> 2	32 µg/mL	32 µg/mL	KJ740181
<i>C. tropicalis</i> 3	16 µg/mL	8 µg/mL	KF616840
<i>C. neoformans</i> 1	64 µg/mL	8 µg/mL	KJ740165
<i>C. neoformans</i> 2	16 µg/mL	16 µg/mL	KJ740167
<i>C. neoformans</i> 3	64 µg/mL	64 µg/mL	KJ740166
<i>C. neoformans</i> 4	64 µg/mL	16 µg/mL	KJ740168
ATCC <i>C. Parapsilosis</i>	2 µg/mL		
ATCC <i>C.krusei</i>	64 µg/mL		

^aCepas de leveduras isoladas de amostras biológicas. FLC – fluconazol, o ^bCIM (concentração inibitória mínima) foi definido como a mais baixa concentração que produziu 50% de redução do crescimento das células fúngicas, após 24h de incubação. O procedimento foi realizado de acordo com o protocolo M27- A3 do CLSI 2008. O intervalo do fluconazol e da curcumina variou de 64 a 0, 125 µg/ mL.

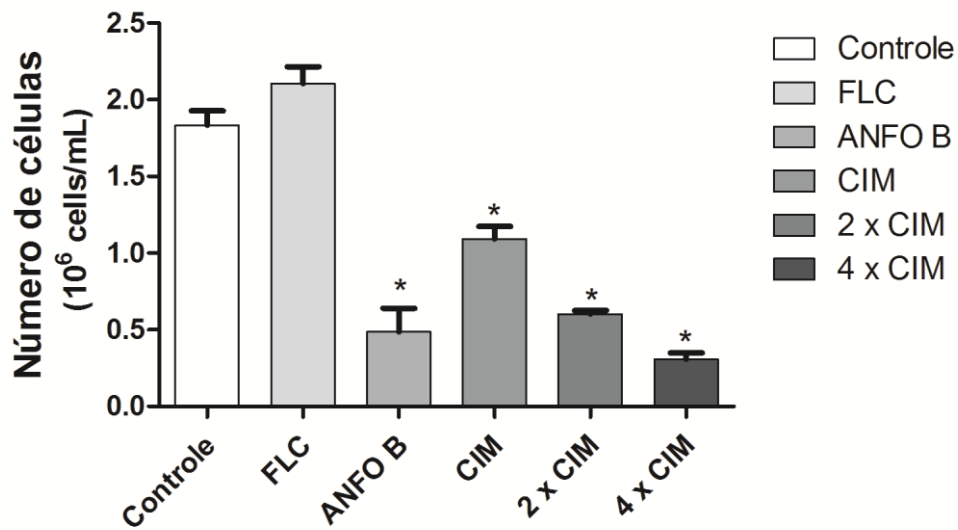


Figura 2: Avaliação por citometria de fluxo da redução no número de células viáveis, em uma única cepa representativa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada com FLC (64 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL) e a Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM), por 24 horas de exposição * p <0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

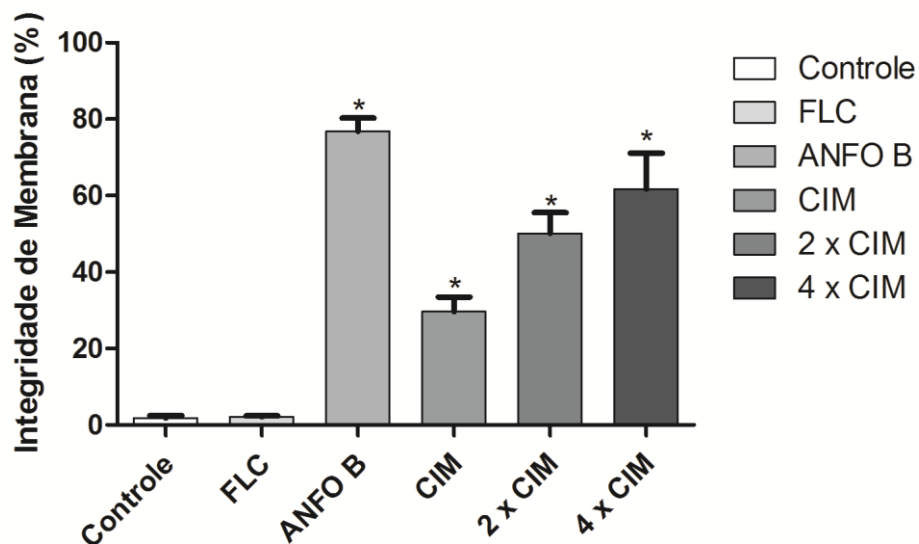


Figura 3: Avaliação da integridade de membrana determinada pelo ensaio de exclusão por iodeto de propídeo (IP), em uma única cepa representativa de *C. albicans* resistente ao FLC tratada com FLC (64 µg / mL), ANFO B (4 µg / mL) e a Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM), por 24 horas de exposição.* p <0,05 comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.3 Avaliação do Potencial Transmembrana Mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Após 24 h de exposição à curcumina, alterações significativas no $\Delta\psi_m$ foram observadas na estirpe de *C. albicans* resistentes ao fluconazol (Figura 4), em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$). Os resultados sugerem que este composto pode afetar a função respiratória mitocondrial, causando um colapso no $\Delta\psi_m$, fazendo com que a Rh 123 não se acumule nas mitocôndrias, efeito dose-dependente. As células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol tratadas com curcumina apresentou um aumento de $10,03 \pm 1,59$ % (CIM), $21,99 \pm 2,50$ % (2x CIM) e $36,53 \pm 5,17$ % (4x CIM), quando comparadas ao grupo controle ($3,44 \pm 1,03$ %) ($p < 0,05$) (Figura 4).

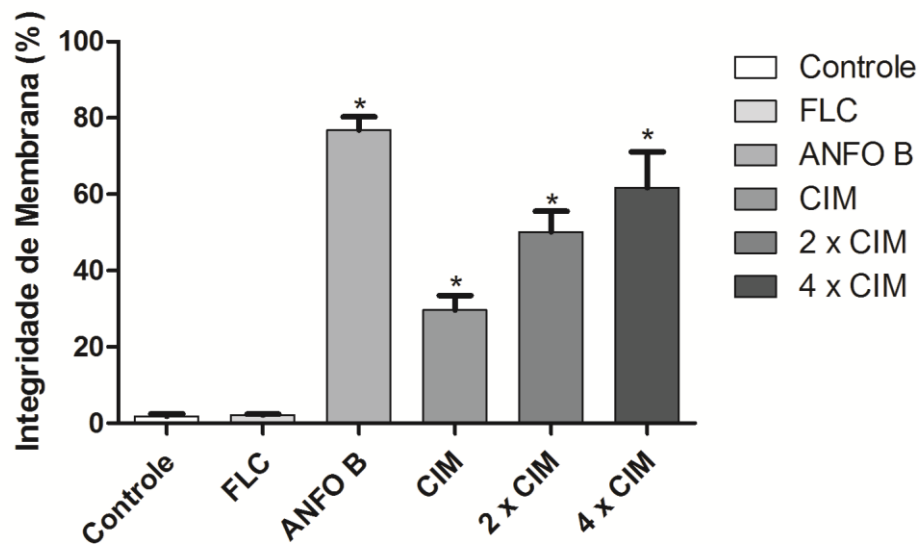


Figura 4: Avaliação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) em cepa de *C. albicans* resistente ao FLC. As células foram marcadas com rodamina 123 (50 nM). O gráfico mostra as cepas tratadas com FLC (64 μg / mL), ANFO B (4 μg / mL) e a Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM), por 24 horas de exposição.* $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6.4 Danos ao DNA

Como mostrado na Figura 5, a curcumina promoveu danos ao DNA nas células de *C. albicans* resistente ao fluconazol em comparação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). O tratamento das estirpes com o fluconazol não mostrou danos no DNA após 24 horas de exposição. As células tratadas com a curcumina exibiram percentuais de índices danos de $22,50 \pm 5,04$ (CIM), $37,50 \pm 5,09$ (2x CIM) e $74,50 \pm 4,59$ (4x CIM), quando comparadas ao

grupo controle ($10,50 \pm 4,08$) ($p < 0,05$). Observamos, também, que a *C. albicans* resistente ao FLC, quando incubada com as enzimas FPG e ENDO III, apresentou um aumento significativo nos valores do índice de dano em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) após o tratamento com a curcumina (Figura 6).

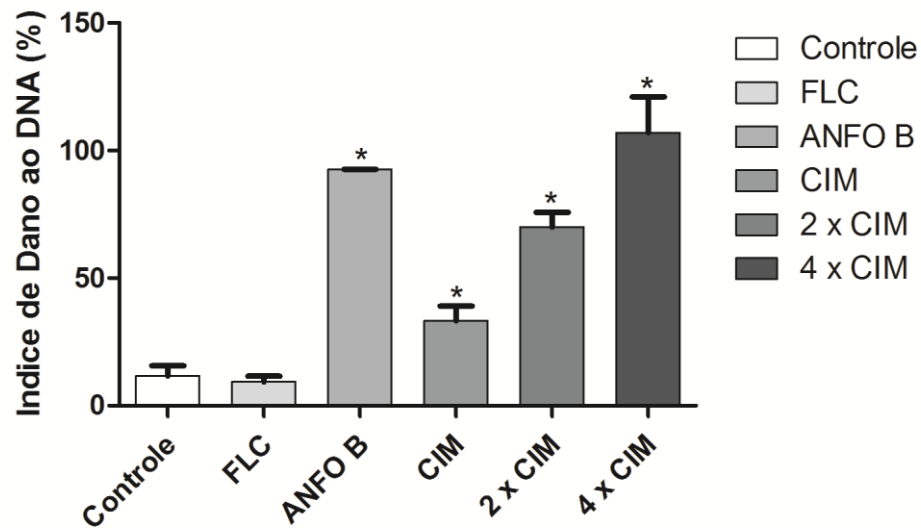


Figura 5: Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa, em *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC ($64 \mu\text{g} / \text{mL}$), ANFO B ($4 \mu\text{g} / \text{mL}$) e a Curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM), por 24 horas de exposição.

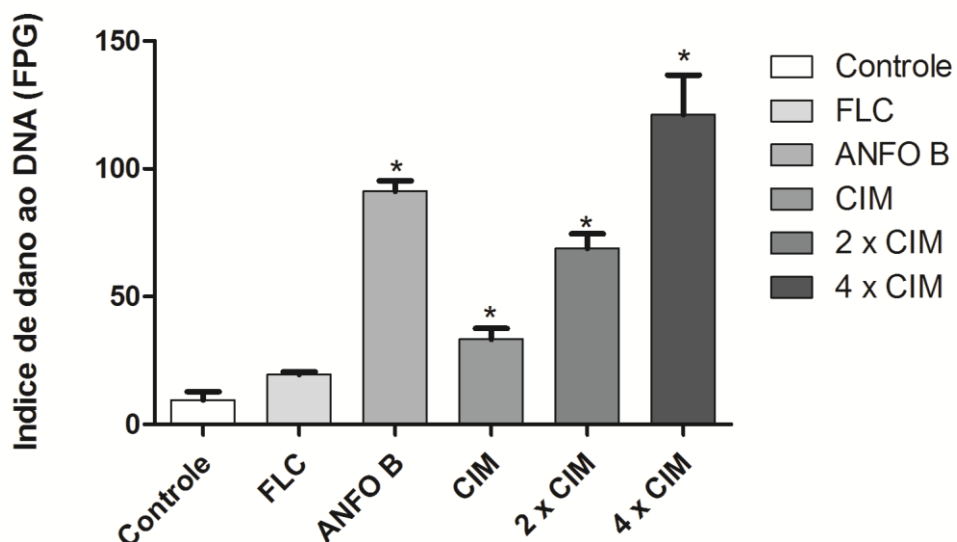


Figura 6: Avaliação do índice de dano ao DNA através da distribuição dos índices de danos, utilizando a versão alcalina do ensaio do cometa modificada (FPG e ENDO III), em *C. albicans* resistente ao FLC. As leveduras foram expostas ao FLC ($64 \mu\text{g} / \text{mL}$), ANFO B ($4 \mu\text{g} / \text{mL}$) e a curcumina (CIM, 2x CIM, 4x CIM), por 24 horas de exposição.

6.5 Externalização da Fosfatidilserina em células de *C. albicans* após exposição a curcumina.

A Figura 7 demonstra que a curcumina promoveu externalização da fosfatidilserina nas células de *C. albicans* resistente ao fluconazol em comparação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). O tratamento da estirpe com o fluconazol (24 h de exposição) não mostrou a externalização da fosfatidilserina. As células tratadas com a curcumina (24 h de exposição) exibiram percentuais de células anexina positivas de $8,89 \pm 2,21\%$ (CIM), $21,61 \pm 5,42\%$ (2x CIM) e $46,74 \pm 5,46\%$ (4x CIM), quando comparadas ao grupo controle ($3,97 \pm 0,67\%$) ($p < 0,05$).

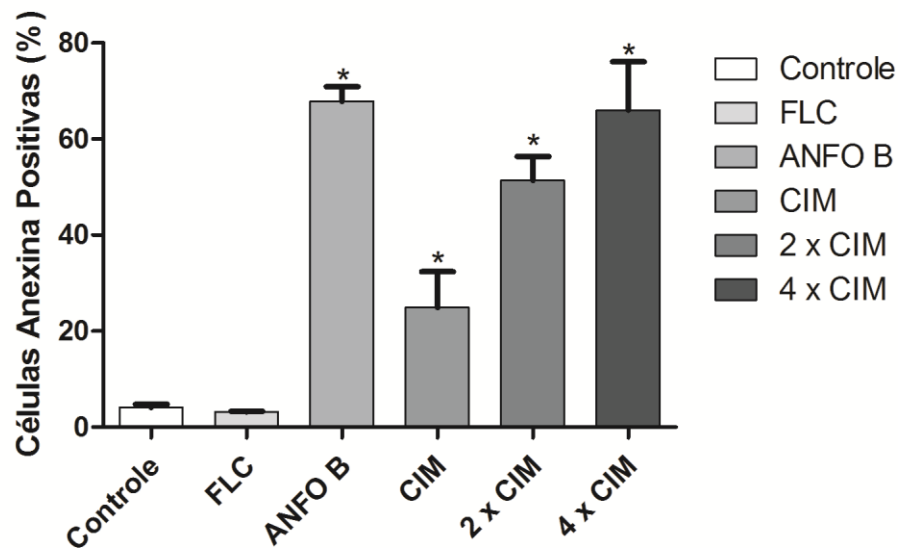


Figura 7: Externalização da fosfatidilserina pela marcação com anexina V. A intensidade de fluorescência indica a quantidade de células com exposição da fosfatidilserina quando tratadas com a Curcumina (CIM, 2xCIM, 4xCIM). * $p < 0,05$ comparado com o controle por ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls

7. DISCUSSÃO

No presente trabalho, observamos uma falha na terapêutica do fluconazol frente às cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* (tabela 1). O fluconazol (FLC) é o principal agente utilizado para o tratamento primário das IFIs (NUCCI *et al.*, 2013) e o seu uso indiscriminado é apontado como uma das principais causas para o surgimento da resistência nas espécies de *Candida não albicans* (CALDERONE *et al.*, 2014).

A resistência antifúngica emergiu como um grande problema clínico para os pacientes imunocomprometidos e hospitalizados com alto risco de infecções fúngicas (PFALLER, 2012). Dentro deste contexto, o uso concomitante das drogas fungistáticas, bem como a falta de medicamentos fungicidas, frequentemente resulta numa seleção de estirpes que teriam a capacidade de suportar a ação de antifúngicos comumente utilizados, e demonstrar resistência a múltiplas drogas (MDR). Com o intuito de buscar novos fungicidas, exploramos o potencial antifúngico da curcumina.

O presente estudo aponta para um efeito antifúngico da curcumina frente a cepas de leveduras patogênicas resistentes ao fluconazol, incluindo cepas de *Candida* spp. (8 e 32 µg/ml) e *Cryptococcus neoformans* (8-64 µg/ml). A sensibilidade à curcumina também foi observada em estudo realizado por Martins e colaboradores (2009), onde a curcumina foi testada frente diversas cepas, ATCC e clínicas, de várias espécies de fungos, entre os quais, *Candida* spp e *Cryptococcus* spp. Em outro trabalho descrito por Neelofar e colaboradores (2011), a curcumina foi testada contra 14 cepas de *Candida* spp., onde esta molécula exibiu propriedades antifúngicas contra todas as estirpes testadas, com CIM's variando de 250 a 2000 µg/ml. Dessa forma, nossos resultados demonstraram uma atividade anticandida da curcumina em concentrações muito inferiores as descritas acima (8-32 µg/ml), demonstrado o potencial do composto curcumina frente às cepas em estudo.

Em um trabalho realizado por Ludwing e colaboradores (2013), a curcumina foi capaz de inibir o crescimento de cepas ATCC de *C. neoformans* com uma faixa de atividade entre 31,25 - 62,5 µg/ml. Esses dados corroboram com os do presente trabalho, tendo em vista que a faixa encontrada foi entre 8 - 64 µg/ml.

De acordo com os resultados promissores da Concentração Inibitória Mínima (CIM) da curcumina frente às cepas de *Candida* spp., (8 µg/ml), foi analisada uma única cepa representativa (*Candida albicans* 2), para avaliação dos testes da citometria de fluxo, em que levantou-se a hipótese que às cepas de *Candida albicans* ao serem expostas a curcumina ocasionou danos significativos ao DNA, iniciando um ciclo de quebras totais nas cadeias de

DNA de acordo com o teste versão alcalina do ensaio do cometa, levando posteriormente a capacidade de induzir a perda da integridade da parede celular, prejudicar a função mitocondrial, seguida pelo processo de morte por apoptose.

Em relação aos diversos mecanismos de ação descritos para a curcumina, existem evidências de que o DNA é um dos alvos celulares desta molécula (CARMELO *et al.*, 2015). Nossos resultados sugerem que após a exposição à curcumina nas concentrações CIM (8 µg/ml), 2x CIM (16 µg/ml), 4x CIM (32 µg/ml), as células de *Candida albicans*, apresentaram quebras totais nas cadeias de DNA, onde a fragmentação do DNA nuclear foi evidente no ensaio do cometa. Em um estudo feito por Lu e colaboradores (2009), foi investigado a capacidade da curcumina em promover danos ao DNA em linhagens celulares ganglionares, usando a técnica do cometa. Os respectivos autores verificaram que após 24 e 48 h de incubação na concentração de 10, 25 e 30 µM, o composto curcumina levou a um aumento da migração do DNA. Segundo Ogiwara e colaboradores (2013), a curcumina promove a ruptura da fita dupla do DNA através da inibição da acetilação das histonas no DNA.

De acordo com Cao e colaboradores (2006), a curcumina em doses elevadas ($\geq 10 \mu\text{g/ml}$), promove danos ao DNA nuclear e danos ao DNA mitocondrial, o que levaria a célula a desencadear um processo de morte celular por apoptose. No presente trabalho a curcumina apresentou quebras nas fitas de DNA em doses superiores a 8 µg/ml, o que de certa maneira corrobora com os achados dos autores acima descritos. Ainda segundo Cao e colaboradores (2006), os danos aos ácidos nucléicos ocasionados pela curcumina podem ser decorrentes de condições de estresse oxidativo. É importante destacarmos que modificações estruturais nas bases de nucleotídeos podem acontecer como resultado do estresse oxidativo. Diversos estudos apontam para o papel das espécies reativas de oxigênio (ERO's) no mecanismo de ação da curcumina (KUMAR *et al.*, 2014; SHARMA *et al.*, 2010).

A oxidação das bases nucleotídicas é passível de importância assim como as quebras na cadeia de DNA para a sobrevivência e homeostasia celular (BJELLAND & SEEBERG, 2003). As endonucleases mais comumente utilizadas no ensaio do cometa modificado são: formamido pirimidina DNA-glycosilase (FPG, conhecida como MutM) e endonuclease III (ENDO III). A FPG é específica para purinas oxidadas, especialmente para o 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8-oxoGua) (SILVA JR *et al.*, 2011). O atual trabalho mostrou a média de danos ao DNA causados pela exposição a curcumina. Constatou-se que após a incubação com a enzima FPG, houve claramente um aumento na migração do DNA das células que foram

tratadas com a curcumina. Esse aumento foi devido provavelmente à capacidade da enzima FPG em reconhecer as bases purinas (adenina e guanina) dentro do DNA.

A morte celular por apoptose é um programa de suicídio peculiar que se caracteriza pela externalização de fosfatidilserina na membrana plasmática, condensação da cromatina e fragmentação do DNA, danos mitocondriais e liberação do Citocromo C da mitocôndria para o citosol (SUKHANOVA *et al.*, 2012).

A condensação e a fragmentação do DNA são características que representam um passo irreversível na condução da morte celular. A detecção de apoptose, numa fase inicial pode ser determinada utilizando Anexina V. Esse marcador na presença do íon Ca^{2+} se liga com elevada afinidade à fosfatidilserina presente nas membranas das células apoptóticas (HWANG *et al.*, 2012). Entretanto, a co-coloração do FITC-conjugado Anexina V com o PI, permite a discriminação entre apoptose precoce e necrose (EISENBERG *et al.*, 2010).

Após a exposição das cepas de *Candida albicans* a curcumina na concentração CIM (8 $\mu\text{g/ml}$), 2x CIM (16 $\mu\text{g/ml}$) e 4x CIM (32 $\mu\text{g/ml}$), na presença do marcador citofluorométrico Iodeto de Propídio (PI), foi observado uma diminuição no número de células viáveis, indicando assim danos às membranas celulares, com possível comprometimento de suas funções. Segundo os experimentos de Azad e colaboradores (2013), em estirpes mutantes de *Saccharomyces cerevisiae*, os resultados do ensaio de viabilidade sugeriram que as células começaram a tornar-se metabolicamente inativas após o tratamento com a curcumina. De acordo com Di Marino e colaboradores (2012), uma eventual ruptura na membrana microbiana pode levar uma permeabilização da membrana, permitindo dessa forma que os compostos possam atingir alvos intracelulares.

A absorção aumentada de PI nas células de *C. albicans* resistentes ao fluconazol é um indicativo de que estes compostos promovem a morte celular, considerando-se que este marcador só se liga ao DNA nuclear de células mortas (XU *et al.*, 2010). Recentemente, Kumar e colaboradores (2014) relataram que após o tratamento com a curcumina isolada ou associada a antifúngicos em células de *C. albicans*, houve um aumento na permeabilização da membrana ao corante PI, o que corrobora com os nossos resultados, onde, o crescimento fúngico e o desenvolvimento e a capacidade de sobreviver sob condições de estresse ambientais são dependentes da integridade da membrana e da parede celular.

Entretanto, apesar de parecer correto afirmar que as células de microrganismos com comprometimento das membranas sejam consideradas mortas, ou até mesmo que células com a membrana intacta sejam células ativas, essas alegações não são necessariamente subsistentes (BERNEYET *et al.*, 2007; NEBE-VON-CARONET *et al.*, 2000). Portanto se faz

necessária uma avaliação do comprometimento de outros sítios celulares nas células microbianas, após a exposição de drogas (DA SILVA *et al.*, 2013; ANDRADE NETO *et al.*, 2014).

Diversos trabalhos sobre as funções e a dinâmica mitocondrial vêm evidenciando o papel crucial dessa organela em processos biológicos, tais como: envelhecimento e morte celular programada (MAZZONI *et al.*, 2013). No presente trabalho, a função mitocondrial das células de *C. albicans* parece ter sido afetada após exposição à curcumina.

Em nossos achados, a função mitocondrial das células de *C. albicans* parece ter sido afetada após exposição à curcumina. De acordo com Morin e colaboradores (2001) a curcumina induz um aumento na permeabilidade da membrana mitocondrial, resultando na perda do potencial de membrana e a inibição da síntese de ATP, através da abertura do poro de transição da permeabilidade. O colapso no $\Delta\psi_m$ pode conduzir a aberturas de poros transientes nas membranas mitocondriais e a liberação de fatores pró-apoptóticos no citosol (HWANG *et al.*, 2012; LUDOVICO *et al.*, 2001). Estudos publicados recentemente pelo nosso grupo (LABEL) demonstram que danos à mitocôndria se mostram precursores do processo de morte celular, atuando de forma irreversível (DA SILVA *et al.*, 2013, ANDRADE NETO *et al.*, 2014; ANDRADE NETO *et al.*, 2015). De acordo com os experimentos de Mahmmoud (2011) e Neelofar e colaboradores (2011), a curcumina parece atuar, também, inibindo várias ATPases eucarióticas, o que pode vir a contribuir para alterações no potencial de membrana mitocondrial do fungo.

Nossos resultados sugerem que a curcumina induziu a morte celular por apoptose em cepas de *C. albicans* resistentes ao fluconazol. Esses dados corroboram os resultados de Andrade Neto e colaboradores (2015), que encontraram características semelhantes de morte celular em leveduras tratadas com moléculas derivadas de compostos de naftoquinonas. Em um estudo conduzido por SHARMA e colaboradores (2010), a curcumina induziu apoptose em estirpes de *C. albicans*, fato este que corrobora com nossos achados. O processo apoptótico induzido pelo composto curcumina ocorre devido à ativação de uma via de transdução com múltiplos sinais (LIU *et al.*, 2013).

Com base nas características da morte celular observadas, é levantada a hipótese de que o respectivo composto parece exercer sua atividade antifúngica em sítios específicos próximos ao DNA, resultando em morte celular por apoptose. O presente trabalho aponta para uma eficaz atividade biológica da curcumina, sugerindo que esse pode ser usado como potencial agente antifúngico para tratamento de candidemias. Contudo, mais ensaios farmacológicos e de toxicidade serão necessários para confirmar esta hipótese.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, o composto curcumina apresenta atividade antifúngica *in vitro* contra cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans* resistentes ao fluconazol. Com base nas características da morte celular observadas, é levantada a hipótese de que a curcumina parece exercer sua atividade antifúngica em sítios específicos próximos ao DNA, resultando em morte celular por apoptose. O presente trabalho aponta para uma eficaz atividade biológica deste composto, sugerindo que esse pode vir a ser usado como um adjuvante para tratamento de candidemias. Contudo, mais ensaios farmacológicos e de toxicidade serão necessários para confirmar esta hipótese.

REFERÊNCIAS

AERTS, A.M. *et al.* The antifungal plant defensin RsAFP2 from radish induces apoptosis in a metacaspase independent way in *Candida albicans*. **FEBS Letters**, v. 583, n., p. 2513–2516, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19596007>. Acesso em: 12 jan.2014.

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential Therapeutic Effects of Curcumin, the Anti-inflammatory Agent, Against Neurodegenerative, Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, Autoimmune and Neoplastic Diseases. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 41, n.1, p. 40-59, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2637808/>. Acesso em: 22 jan.2013.

ALTSCHUL, S. F. *et al.* Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**, v. 215, n. 3, p. 403-410. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2231712>. Acesso em: 14 jul.2014.

ANDRADE NETO, J. B. *et al.* Antifungal Activity of Naphthoquinoidal Compounds In Vitro against Fluconazole-Resistant Strains of Different *Candida* Species: A Special Emphasis on Mechanisms of Action on *Candida tropicalis*. **PLoS ONE** 9: e93698. 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24817320>. Acesso em: 12 abr.2015.

ANDRADE NETO, J.B. *et al.* Effects of Piperonal Nitro Derivatives on *Candida* species: Antifungal Activity against Fluconazole-Resistant Strains is Associated with Oxidative DNA Damage. **Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci**, v. 4, n. 4, p. 777-792, 2015. Disponível em: <http://www.ijcmas.com/vol-4-4/Joao%20Batista%20de%20Andrade%20Neto,%20et%20al.pdf>. Acesso em: 12 abr.2015.

ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500779>. Acesso em: 08 abr.2015.

ARIKAN, S. Current status of antifungal susceptibility testing methods. **Med. Mycol.**, v. 45, n. 7, p. 569-587, nov. 2007.

ASSOCIAÇÃO ARGENTINA DE MICROBIOLOGIA. Genotipos y epidemiología de aislamientos clínicos de *Cryptococcus neoformans* en Corrientes, Argentina. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 1, n. 47, p.82-83, 2015. Disponível em: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412015000100017&lng=es&nrm=iso. Acesso em: 08 abr.2015.

AZAD, G. K. *et al.* Depletion of Cellular Iron by Curcumin Leads to Alteration in Histone Acetylation and Degradation of Sml1p in *Saccharomyces cerevisiae*. **PLoS One**, v. 8, n. 3: 59003, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23520547>. Acesso em: 09 abr.2015.

BAL, A.M. The echinocandins: three useful choices or three too many? **Int. Journal Antimicrobial Agents**, v. 35, n. 1, p.13–18, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19942413>. Acesso em: 10 abr.2015.

BALTAZAR, L.M.; RIBEIRO, M.A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Rev. Soc. Bras. Med.Trop.**, v.41, n.5, p. 449-453, 2008. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000500003. Acesso em: 10 abr.2015.

BARBOSA-FILHO, J. M. *et al.* Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n.1, p. 141-148, 2007. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-695X2007000100022&script=sci_arttext. Acesso em: 10 abr.2015.

BASSETTI, M. *et al.* Clinical and Therapeutic Aspects of Candidemia: A Five Year Single Centre Study. **Plos One**, v. 10, n. 5, p.1-12, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26010361>. Acesso em: 02 abr.2015.

BERGAMASCO, M. *et al.* Epidemiology of candidemia in patients with hematologic malignancies and solid tumours in Brazil. **Mycoses**. 2012. doi:10.1111/myc.12013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23043234>. Acesso em: 02 abr.2015.

BERNEY, M. *et al.* Assessment and Interpretation of Bacterial Viability by Using the LIVE/DEAD BacLight Kit in Combination with Flow Cytometry. **Applied Environmental Microbiology**, v. 73, n. 10, p. 3283–3290, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17384309>. Acesso em: 02 abr.2015.

BISHT, S. *et al.* Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (nanocurcumin): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1868037/>. Acesso em: 02 abr.2015.

BJELLAND, S.; SEEBERG, E. Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. **Mutation Research**, v. 531, n. 1-2, p. 37-80, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

BRANCO, J. A. V. Estudo molecular da resistência antifúngica de *Candida parapsilosis*. 2012. 48 f. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Aplicada) – Universidade de Aveiro, Aveiro – Portugal, 2012.

CAEIRO, J.P. *et al.* Epidemiologia de candidemia en cordoba republica argentina. Estudio de vigilancia de cinco instituciones. **Revista de La Facultad de Ciencias Medicas**, v. 2, n. 71, p.89-93, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

CALDERONE, R. *et al.* Antifungal drug discovery: the process and outcomes. **Future Microbiol.**, 2014, 9, p.791-805. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> Acesso em: 10 abr.2015.

CAO, J. *et al.* Curcumin induces apoptosis through mitochondrial hyperpolarization and mtDNA damage in human hepatoma G2 cells. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 43, n. 6, p.968-975, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

CARMELLO, J.C. *et al.* Genotoxic effect of photodynamic therapy mediated by curcumin on *Candida albicans*. **FEMS Yeast**, v. 15, n. 4, pii: fov018, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

CAVALEIRO, C. *et al.* Antifungal activity of Juniperus essential oils against dermatophyte, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1333-1338, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

CHANDRAM, B. Y GOEL, A. A randomized, pilot study to assess the efficacy and safety of curcumin in patients with active rheumatoid arthritis. **Phytother Res.**, v. 11, p. 1719-1725, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

CHANDRASEKAR, P. Management of invasive fungal infections: a role for polyenes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 66, n. 3, p. 457–465, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

CHASSOT, F. *et al.* Can intrauterine contraceptive devices be a *Candida albicans* reservoir? **Contraception**, v. 77, p. 355–359, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

CHI, H.W., *et al.* *Candida albicans* versus non-*albicans* bloodstream infections: The comparison of risk factors and outcome. **J Microbiol Immunol Infect.**, v. 44, p. 369-375, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 jan.2015.

CHOU. H.H. *et al.* Multilocus sequence typing of *Candida tropicalis* shows clonal cluster enriched in isolates with resistance or trailing growth of fluconazole. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v.58, p. 427–433. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 jan.2015.

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

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. **CLSI document M27-S4**. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 2012.

COGLIATI, M. Global Molecular Epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*: An Atlas of the Molecular Types. **Scientifica**, v. 2013, p.1-23, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 jan.2015.

COLOMBO, A. *et al.* Prospective observational study of candidemia in Sao Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v. 28, p. 570-576, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 fev.2015.

CORNISTEIN, W., *et al.* Candida: epidemiology and risk factors for non-albicans species. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v. 31, n. 6, p. 380-4, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 fev.2015.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRÍGUEZ-TUDELA, J. L. Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? **Rev. Iberoam. Micol.**, v. 19, p. 133-138, 2002.

CUENCA-ESTRELLA, M. *et al.* Comparative Evaluation of NCCLS M27-A and EUCAST Broth Microdilution Procedures for Antifungal Susceptibility Testing of *Candida* Species. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**, [s.l.], v. 46, n. 11, p.3644-3647, 1 nov. 2002. Disponível em: <http://aac.asm.org/content/46/11/3644.short> Acesso em: 01 ago. 2015.

DA SILVA, C.R. *et al.* Synergistic Effect of the Flavonoid Catechin, Quercetin, or Epigallocatechin Gallate with Fluconazole Induces Apoptosis in *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.58, n. 3, p.1468-78, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 fev.2015.

DA SILVA, C.R. *et al.* Synergistic Effects of Amiodarone and Fluconazole on *Candida tropicalis* Resistant to Fluconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 4,

p. 1691-1700, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 fev.2015.

DEL POETA M; CASADEVALL A. Ten challenges on *Cryptococcus* and Cryptococcosis. **Mycopathologia**, v. 173, p. 303-310, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 14 abr.2015.

DI MARINO, S. *et al.* Antifungal peptides at membrane interaction. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.51, p. 154-162, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 14 abr.2015.

DIEKEMA D. *et al.* The changing epidemiology of healthcare-associated candidemia over three decades. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 73, n. 1, p. 45–48, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 14 abr.2015.

DOU, H. *et al.* Molecular epidemiology of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* in China between 2007 and 2013 using multilocus sequence typing and the DiversiLab system. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 1, n. 34, p.753-762, 2015. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 15 abr.2015.

DURAIKANDIYAN, V.; AYYANAR, M., IGNACIMUTHU, S. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6; n. 35, p., 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 15 abr.2015.

EISENBERG, T. *et al.* Necrosis in yeast. **Springer Science**, LLC, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

ESPINEL-INGROFF, A. *et al.* Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). **J Clin Microbiol**, v. 48, n. 9, p. 3251-3257, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 19 abr.2015.

ESTRELLA, M.C. Combinations of antifungal agents in therapy—what value are they? **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 54, p. 854-869, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 25 abr.2015.

FAVALESSA, O.C. *et al.* Molecular typing and in vitro antifungal susceptibility of *Cryptococcus* spp from patients in Midwest Brazil. **J Infect Dev Ctries**, v. 8, n. 8, p.1037-1043, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 26 abr.2015.

FILIÚ, W.F.O. *et al.* Cativeiro de aves como fonte de *Cryptococcus neoformans* na cidade de Campo Grande. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 35, n. 6, p. 591-595. 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

FREITAS, D. D. **Comparação do perfil de sensibilidade de cepas de *candida* spp. Isoladas no Ceará, nos anos de 2009-2012, frente ao fluconazol.** 2014. 38 f. Monografia (Especialização) - Curso de Análises Clínicas, Faculdade Cathedral, Fortaleza, 2014.

GAMARRA, S. *et al.* Mechanism of the synergistic effect of amiodarone and fluconazole in *Candida albicans*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 54, p. 1753-1761, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

GAO, Y. *et al.* Synergistic effect of doxycycline and fluconazole against *Candida albicans* biofilms and the impact of calcium channel blockers. **FEMS Yeast Res**, v. 13, n. 5, p. 453-462, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 22 abr.2015.

GRYNKIEWICZ, G. Y; SLIFIRSKI, P. Curcumin and curcuminoids in quest for medicinal status. **Acta Biochimica Polonica (ABP)**, v. 59, n. 2, p. 201-212, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 22 abr.2015.

GUIMARÃES, T. *et al.* Epidemiology and predictors of a poor outcome in elderly patients with candidemia. **International Journal of Infectious Diseases**, v.16, p.442-447, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 abr.2015.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemias. **Clin Microbiol Infect.**, v. 20, p. 5-10, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 abr.2015.

GUO, Q. *et al.* Synergistic activity of azoles with amiodarone against clinically resistant *Candida albicans* tested by checkerboard and time–kill methods. **Journal of Medical Microbiology**, v. 57, p. 457-462, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 05 abr.2015.

HARRIOTT, M.M. *et al.* *Candida albicans* forms biofilms on vaginal mucosa. **Microbiology**, v. 156, p.3635–3644, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 abr.2015.

HINRICHSEN, S.L.F. *et al.* *Candida* isolates in tertiary hospitals in Northeastern Brazil. **Jornal Brasileiro de Microbiologia**, n 40, p325-328, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 abr.2015.

HISHIKAWA, N. *et al.* Effects of turmeric on Alzheimer's disease with behavioral and psychological symptoms of dementia. **Ayu**, v. 33, n. 4, p. 499-504, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 03 abr.2015.

HORN, D. L. *et al.* Epidemiology and Outcomes of Candidemia in 2019 Patients: Data from the Prospective Antifungal Therapy Alliance Registry. **Clinical Infectious Diseases**, v.48, p.1695–703, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 abr.2015.

HUANG, X.; MADAN, A. CAP3: A DNA sequence assembly program. **Genome Research**, v. 9, n. 9, p.868-877, 1999. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 07 abr.2015.

HWANG, I. *et al.* Amentoflavone Stimulates Mitochondrial Dysfunction and Induces Apoptotic Cell Death in *Candida albicans*. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 207–218, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 jan.2015.

JIANHUA, W.; HAI, W. “Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*,” **Journal of Medical Colleges of PLA**, v. 24, n. 3, p. 142–147, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 jan.2015.

KARAMAN, M.; *et al.* Effects of Curcumin on Lung Histopathology and Fungal Burden in a Mouse Model of Chronic Asthma and Oropharyngeal Candidiasis. **Archives of Medical Research**, v. 42, p. 79-87, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 15 jan.2015.

KATHIRAVAN, M.K. *et al.* The biology and chemistry of antifungal agents: a review. **Bioorg Med Chem**, v. 20, n. 19, p. 5678-5698, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 21 jan.2015.

KHALIL, O. A. K. *et al.* Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. **Food Chemistry**, v. 133, p. 1001–1005, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: Acesso em: 21 jan.2015.

KHAN, N. *et al.* Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, v. 83, p. 434–440, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 17 jan.2015.

KHAN, R. *et al.* Antimicrobial activity of five herbal extracts against multi drug resistant (MRD) strains of bacteria and fungus of clinical origin. **Molecules**, n. 13, p. 1-12, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 21 jan.2015.

KOTHAVADE, M.M. *et al.* *Candida tropicalis*: its prevalence, pathogenicity and increasing resistance to fluconazole. **Journal of Medical Microbiology**, v.59, p.873-880, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

KREUSCH, A.; KARSTAEDT, A.S. Candidemia among adults in Soweto, South Africa, 1990–2007. **International Journal Of Infectious Diseases**, v. 17, n. 8, p.621-623, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

KRONSTAD, J.W. *et al.* Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nat Rev Microbiol.**, n. 9, v. 3, p. 193-203, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 jan.2015.

KUMAR, A. *et al.* Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 58, n 1, p. 167-175, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 jan.2015.

KURTZMAN CP, FELL JW, BOEKHOUT T. The yeasts, a taxonomic study. **Burlington: Elsevier Science**; 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 jan.2015.

LIU, T.Y. *et al.* Curcumin induces apoptosis in gallbladder carcinoma cell line GBC-SD cells. **Cancer Cell**, v. 13, n. 1, p. 64, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

LU, H.F. *et al.* Curcumin-induced DNA damage and inhibited DNA repair genes expressions in mouse-rat hybrid retina ganglion cells (N18). **Neurochemical Research**, v. 34, n. 8, p.1491-1497, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 jan.2015.

LUDOVICO P, SANSONETTY F, CÔRTE-REAL M. Assessment of mitochondrial membrane potential in yeast cell populations by flow cytometry. **Microbiology**, v.147, n. 12, p. 3335-3343, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 jan.2015.

LUDWIG, D.B. Estudo dos efeitos antifúngico e citotóxico da curcumina na presença de antioxidantes. 2013. 69f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual do Centro Oeste, Guarapuava, 2013.

MAHMMOUD, Y.A. Curcumin is a lipid dependent inhibitor of the Na,K-ATPase that likely interacts at the protein-lipid interface. **Biochimica Biophysica Acta.**, v. 1808, n. 1, p. 466-473, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 14 abr.2015.

MARTINEZ, R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. **Jornal brasileiro de pneumologia.** v. 32, n. 5, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

MARTINS, C. V. B. *et al.* Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, London, v. 63, p. 337–339, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

MARTINS, I. M. C. L. B. Avaliação da ação antifúngica de citrus limon linn. frente a leveduras do gênero candida. 76p. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Bucal) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2009.

MARTINS, L. M. S. *et al.* Genotypes of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* as agents of endemic cryptococcosis in Teresina, Piauí (northeastern Brazil). **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Teresina, v. 6, n. 106, p.725-730, ago. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

MAZZONI, C. *et al.* Yeast Stress, Aging, and Death. **Oxidative Medicine Cell Longevity.** 2013:684395, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>.

MEDRANO, D. *et al.* Candidemia in a Brazilian hospital: the importance of Candida parapsilosis. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.** v. 48, p. 17-20, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

MEYER, E., *et al.*, Antifungal use in intensive care units. **J Antimicrob Chemother**, v. 60, n. 3, p. 619-24. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 19 jan.2015.

MEZZARI, A. *et al.* Criptococose em um Hospital Público de Porto Alegre: dados epidemiológicos. **J Infect Control**, v. 3, n. 2, p.135-139, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 fev.2015.

MILOSHEV, G.; MIHAYLOV, I.; ANACHKOVA, B. Application of the single cell electrophoresis on yeast cells. **Mutation Research**, v. 513, n. 1-2, p. 69-74, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

MIRANDA, L. N. Colonização por *Candida* em indivíduos com candidemia. 2007. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

MOKADDAS, E.; AL-SWEIH, N.; KHAN, Z.U. Species distribution and antifungal susceptibility of *Candida* bloodstream isolates in Kuwait: a 10-year study. **J Med Microbiol.**, v. 56, p. 255-259, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 fev.2015.

MONDELLO, F. *et al.* *In vivo* activity of terpinen-4-ol, the main bioactive component of *Melaleuca alternifolia* Cheel (tea tree) oil against azole-susceptible and -resistant human pathogenic *Candida* species. **BMC Infection Diseases**, v. 6, n. 158, p., 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 13 fev.2015.

MORACE, G. *et al.* Antifungal susceptibility of invasive yeast in Italy: the Gisia3 study in critically ill patients. **BMC Infectious Diseases**, v. 11, n. 130, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 fev.2015.

MORIN, D. *et al.* Curcumin induces the mitochondrial permeability transition pore mediated by membrane protein thiol oxidation. **FEBS Letters**, v. 495, n. 1-2, p. 131-136, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

MUÑOZ, A. J. *et al.* Antifungal agents: Mode of action in yeast cells. **Revista española de quimioterapia**, v. 19, p.130-139, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 fev.2015.

NAGAPPAN, V.; DERESINSKI, S. Reviews of anti-infective agents: posaconazole: a broad-spectrum triazole antifungal agent. **Clin Infect Dis.**, v. 45, n. 12, p. 1610-1617, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

NEBE-VON-CARON, G. *et al.* Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. **Journal Microbiological Methods**, v.42, n.1, p.97-114, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 fev.2015.

NEELOFAR, K. *et al.* Curcumin as a promising anticandidal of clinical. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 57, n.3, p. 204-210, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 19 fev.2015.

NEGRI, M. *et al.* Early State Research on Antifungal Natural Products. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2925-2956, 2014. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of candidemia in Latin America: a laboratory-based survey. **PLoS One**, v. 8, n.3:e59373, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

NUCCI, M. *et al.* Epidemiology of Opportunistic Fungal Infections in Latin America. **Clinical Infectious Diseases**, v.51, n.5, p.561-570, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

NUCCI, M.; COLOMBO, A. L.; Emergence of resistant *Candida* in neutropenic patients. **Braz J Infect Dis.**, v. 6, n. 3, p.124-128, 2002. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

NYILASI, I. *et al.* *In vitro* synergistic interactions of the ejects of various statins and azoles against some clinically important fungi. **FEMS Microbiology Lett**, v. 307, n. 2, p. 175-184, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 fev.2015.

OGIWARA, H. *et al.* Curcumin suppresses multiple DNA damage response pathways and has potency as a sensitizer to PARP inhibitor. **Carcinogenesis**, v. 34, n.11, p. 2486-2497, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

OLIVEIRA, M.H *et al.* Semi-Synthesis: A solution to problems of pharmacological natural products. **Electronic Journal of Pharmacy**, v. 9, n. 1, p. 62-88, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

OMBRELLA, A.M.; RACCA, L.; RAMOS, L. Atividades proteinasa y fosfolipasa de aislamientos de *Candida albicans* provenientes de secreciones vaginales con distintos valores de pH. **Rev Iberoam Micol.**, v. 25, p. 12-16, 2008. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

PARK, B. J. *et al.* *In Vitro* Antifungal Activity of Epigallocatechin 3-*O*-Gallate against Clinical Isolates of Dermatophytes. **Yonsei Medical Journal**, v. 52, n.3, p.535-538, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 02 abr.2015.

PASQUALOTTO, A *et al.* Analysis of independent risk factors for death among pediatric patients with candidemia and a central venous catheter in place. **Infection Control and Hospital Epidemiology**. v. 28, p. 799-804, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

PASSOS, X. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. **Mycopathologia**, v. 163, p. 145-151, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 10 abr.2015.

PEMAN, J.; CANTON, E; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Rev Anti Infect Ther.**, v.7, n. 4, p. 453-460, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 10 abr.2015.

PERDIGÃO NETO, Lauro Vieira. **Aspectos clínicos, epidemiológicos e laboratoriais da criptococose no estado do Ceará entre os anos de 1985 e 2010, bem como efeitos de antirretrovirais inibidores de protease sobre virulência e crescimento de *cryptococcus neoformans* in vitro.** 2011. 124 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Microbiologia Médica,

Departamento de Patologia e Medicina Legal, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

PETRIKKOS, G.; SKIADA, A. Recent advances in antifungal chemotherapy. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.30, p. 108–117, 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 10 abr.2015.

PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v.125, n.1A, p. S3-S13, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 10 abr.2015.

PFALLER, M. A. et al. Comparison of European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) and Etest Methods with the CLSI Broth Microdilution Method for Echinocandin Susceptibility Testing of *Candida* Species. **Journal Of Clinical Microbiology**, [s.l.], v. 48, n. 5, p.1592-1599, 24 mar. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20335424> Acesso em: 01 ago. 2015.

PFALLER, M. A.; ANDESB, D.; DIEKEMA, D. J.; ESPINEL-INGROFF, A.; SHEEHAND, D. Wild-type MIC distributions, epidemiological cutoff values and species-specific clinical breakpoints for fluconazole and *Candida*: Time for harmonization of CLSI and EUCAST broth microdilution methods. **Drug Research Updates**, v. 13, n. 180, p. 180-195, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 10 abr.2015.

PINTÃO, A.M., SILVA I.F. A verdade sobre o açafão. **Workshop Plantas Medicinais e Fitoterapêuticas nos Trópicos**. IICT/CCCM. Lisboa; 2008.

QUINTA, A.S.; MORAIS, C. N. O. **Mechanisms of Antifungal Resistance In Pathogenic Yeasts: Evaluation Of The *In Vitro* and *In Vivo* Expression**. 2012. 265 f. Teses (Doutorado) - Curso de Biomedicina, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Porto, 2012.

RAD, M.M. *et al.* The epidemiology of *Candida* species associated with vulvovaginal candidiasis in an Iranian patient population. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. v. 155, n. 2,

p. 199-203, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

RAJESHKUMAR, R.; SUNDARARAMAN, M. Emergence of Candida spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy – status quo. **Mycoses**, v.55, n.3, p.60-73, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Farmacologia. 6a Edição, Rio de Janeiro: *Editora Elsevier*, Cap. 48, p. 692-697. 2007.

REX, J. H. et al. Antifungal Susceptibility Testing: Practical Aspects and Current Challenges. **Clinical Microbiology Reviews**,[s.l.], v. 14, n. 4, p.643-658, 1 out. 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC88997/> Acesso em: 01 ago. 2015.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.I. et al. EUCAST Definitive Document EDef 7.1: method for the determination of broth dilution MICs of antifungal agents for fermentative yeasts. **Clinical Microbiology And Infection**, [s.l.], v. 14, n. 4, p.398-405, abr. 2008. Disponível em: <http://api.elsevier.com/content/article/PII:S1198743X14628172?httpAccept=text/xml> Acesso em: 05 ago. 2015.

ROSA, C.O.B. Avaliação do efeito de compostos naturais- Curcumina e Hesperidina- na hiperlipidemia induzida em coelhos. [Tese]. Universidade Federal de Viçosa. Minas Gerais. 2009.

ROSENTUL, D. *et al.* Polymorphism in innate immunity genes and susceptibility to recurrent vulvovaginal candidiasis. **J Mycol Med.** 19: 191-196, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

SANGLARD, D. Resistance and tolerance mechanisms to antifungal drugs in fungal pathogens. **Mycologist**, v. 17, p. 74-78, 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

SANGLARD D.; ODDS, F. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **Lancet Infect. Dis.**, v. 2, p. 73-85, 2002.

SCHMALRECK, A. F. *et al.* Species and susceptibility distribution of 1062 clinical yeast isolates to azoles, echinocandins, flucytosine and amphotericin B from a multi-centre study for the Antifungal Susceptibility Testing (AFST) Study Group. **Mycoses**, v. 55, p.124–137. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

SELITRENNIKOFF, CP. Antifungal proteins. **Applied Environmental Microbiology**, v.7, n., p.2883-2894, 2001. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

SEMIGLAZOV, V.F. *et al.* Quality of life is improved in breast cancer patients by Standardised Mistletoe Extract PS76A2 during chemotherapy and follow-up: a randomised, placebo-controlled, double-blind, multicentre clinical trial. **Anticancer Research**, v. 26, n., p. 1519–1529, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

SHAIKH, J. *et al.* Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 37, p. 223-230, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 abr.2015.

SHARMA, M.; *et al.* Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. **FEMS Yeast Research**, v. 10, n. 5, p. 570-578. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 abr.2015.

SIDRIM JJC, ROCHA MFG. *Micologia Médica à Luz de Autores Contemporâneos*. Rio de Janeiro, R.J.: *Editora Guanabara Koogan* LTDA; 2010.

SIFUENTES-OSORNIO, J.; CORZO-LEÓN, D. E.; PONCE-DE-LEÓN, A. Epidemiology of Invasive Fungal Infections in Latin America. **Current Fungal Infection Reports**. v. 1, p. 23-34, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 abr.2015.

SILVA JR, E.N. *et al.* Synthesis and evaluation of quinonoid compounds against tumor cell lines. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.46, n. 1, p.399-410, 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 abr.2015.

SILVA, S. *et al.* *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v.36, p.288-305. 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

SOUZA, M.B. *et al.* Criptococose palpebral: relato de caso. **Arqu. Bras. Oftalmol.**, v.69, n.2, p.265-267, 2006. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 08 abr.2015.

SUKHANOVA, E.I. *et al.* Phenoptosis in yeasts. **Biochemistry (Mosc)**, v. 77, n. 7, p. 761-775. 2007. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 09 abr.2015.

TAYLOR, R. Y LEONARD M. Curcumin for Inflammatory Bowel Disease: A Review of Human Studies. **Alternative Medicine Review**, v. 16, n. 2, p. 152-156. 2011. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 07 abr.2015.

TOBUDIC, S. *et al.* Antifungal susceptibility of *Candida albicans* in biofilm. **Mycoses**, v. 55, n. 3, p. 199-204, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 05 abr.2015.

USTULIN, M. *et al.* O. Plantas medicinais comercializadas no Mercado Municipal de Campo Grande-MS. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 3, p. 805-813, 2009. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 05 abr.2015.

VALE-SILVA, Luis Andre; BUCHTA, Vladimir. Antifungal susceptibility testing by flow cytometry: is it the future?. **Mycoses**,[s.l.], v. 49, n. 4, p.261-273, jul. 2006.

WARNER, S. A. J. Genomic DNA Isolation and Lambda Library Construction. In: Foster GD, Twell D (Eds). *Plant Gene Isolation: Principles and Practice*. **West Sussex: John Wiley**

& Sons. 51-73. 1996. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 05 abr.2015.

WARRILOW, A.G.S. *et al.* Azole binding properties of *Candida albicans* sterol 14 α -Demethylase (CaCYP51). **Antimicrobials Agents Chemotherapy**, v.54, p.4235–4245, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 05 abr.2015.

WHITE, T. *et al.* Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. 315-322 In M A. Innis DH Gefland, JJ Sninsky, and TJ White (ed.), PCR protocols: a guide to methods and applications. Academic Press, San Diego, CA. 315-322. 1990. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 12 abr.2015.

WILLE, M. P. *et al.* Historical trends in the epidemiology of candidaemia: analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, p. 288-292, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 11 abr.2015.

WINGARD, J.R., et al., A randomized, double-blind comparative trial evaluating the safety of liposomal amphotericin B versus amphotericin B lipid complex in the empirical treatment of febrile neutropenia. L Amph/ABLCL Collaborative Study Group. **Clin Infect Dis**, v. 31, n.5, p. 1155-1163, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 07 abr.2015.

WISPLINGHOFF, H. *et al.* Nosocomial Bloodstream Infections in US Hospitals: Analysis of 24,179 Cases from a Prospective Nationwide Surveillance Study. **Clinical Infection Disease**, v.39, n.3, p. 309-317, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 abr.2015.

WITKIN, J. M. Y LI, X. Curcumin, an active constituent [*sic*] of the ancient medicinal herb *Curcuma longa* L.: some uses and the establishment and biological basis of medical efficacy. **CNS Neurol Disord Drug Targets**, v. 12, n. 4, p.1-11, 2013. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 abr.2015.

WONG, J.H. et al. Proteins with antifungal properties and other medicinal applications from plants and mushrooms. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 87, n.4, p. 1221-1235, 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 abr.2015.

XIAO, L. *et al.* Three-dimensional models of wild-type and mutated forms of cytochrome P450 14alpha-sterol demethylases from *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans* provide insights into posaconazole binding. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 2, p. 568-74, 2004. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 abr.2015.

XU, C. *et al.* The anthracenedione compound bostrycin induces mitochondria mediated apoptosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Yeast Research**, v.10, n.3, p. 297-308. 2010. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>. Acesso em: 04 abr.2015.