



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA
RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO**

FERNANDA ALMEIDA ANDRADE

**ATIVIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS NA PRESENÇA DE
ESPÉCIES DE *CANDIDA***

**Goiânia
2017**

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação


Nome completo do autor: Fernanda Almeida Andrade

Título do trabalho: ATIVIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do (a) autor (a)

Data: 15 / 03 / 2017

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

FERNANDA ALMEIDA ANDRADE

**ATIVIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS NA PRESENÇA DE
ESPÉCIES DE *CANDIDA***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro da Universidade Federal de Goiás para obtenção do título de mestre.

Orientadora: Dra. Carolina Rodrigues Costa Carvalho

**Goiânia
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Almeida Andrade, Fernanda

Atividade de compostos naturais e sintéticos na presença de espécies de *Candida* [manuscrito] / Fernanda Almeida Andrade, Carolina Rodrigues Costa, Maria do Rosário Rodrigues Silva. - 2017. LXI, 61 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Carolina Rodrigues Costa.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTSP), Programa de Pós Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, Goiânia, 2017. Bibliografia.

Inclui siglas, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. *Candida*. 2. curcumina. 3. hidrazonas. I. Rodrigues Costa, Carolina. II. Rodrigues Silva, Maria do Rosário. III. Rodrigues Costa, Carolina, orient. IV. Título.

CDU 579



ATA DA REUNIÃO DA BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE FERNANDA ALMEIDA ANDRADE - Aos nove dias do mês de fevereiro do ano de 2017 (09/02/2017), às 8:30 horas, reuniram-se os componentes da Banca Examinadora: Dras. CAROLINA RODRIGUES COSTA, VALÉRIA DE OLIVEIRA e MARIA DO ROSÁRIO RODRIGUES COSTA, para, sob a presidência da primeira, e em sessão pública realizada no INSTITUTO DE PATOLOGIA TROPICAL E SAÚDE PÚBLICA, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada: "ATIVIDADE DE COMPOSTOS NATURAIS E SINTÉTICOS NA PRESENÇA DE ESPÉCIES DE *CANDIDA*", em nível de MESTRADO, de autoria de FERNANDA ALMEIDA ANDRADE, discente do PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pela Orientadora, Profa. Dra. CAROLINA RODRIGUES COSTA, que fez a apresentação formal dos membros da Banca e orientou a Candidata sobre como utilizar o tempo durante a apresentação de seu trabalho. A palavra a seguir, foi concedida ao autor da dissertação que, em 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da Banca arguiu a Candidata, tendo-se adotado o sistema de diálogo seqüencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da defesa. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº. 1406/2016 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro a Banca, em sessão secreta, expressou seu julgamento, considerando a candidata **Aprovada** ou **Reprovada**:

Banca Examinadora

Dra. Carolina Rodrigues Costa
Dra. Valéria de Oliveira
Dra. Maria do Rosário Rodrigues Silva

Aprovada / Reprovada

Aprovada
Aprovada
Aprovada

Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou a candidata habilitada (Habilitada ou não Habilitada), cumprindo todos os requisitos para fins de obtenção do título de MESTRE EM BIOLOGIA DA RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO, pela Universidade Federal de Goiás. Cumpridas as formalidades de pauta, às 11 h 00 min, a presidência da mesa encerrou esta sessão de defesa de dissertação e para constar eu, JOSÉ CLEMENTINO DE OLIVEIRA NETO, secretário do Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro, lavrei a presente Ata que depois de lida e aprovada, será assinada pelos membros da Banca Examinadora e por mim em duas vias de igual teor. A Banca Examinadora aprovou a seguinte alteração no título da Dissertação:

Dra. Carolina Rodrigues Costa (IPTSP/UFV)
Dra. Valéria de Oliveira (FF/UFV)
Dra. Maria do Rosário Rodrigues Costa (IPTSP/UFV)
Secretário da Pós-Graduação:

**CONFEREÇ
O ORIGINAL**
José Clementino de Oliveira Neto
Assistente em Administração
Pós-Graduação/IPTSP/UFV
SECRETÁRIO

Assinatura
Carolina R. Costa
Valéria de Oliveira
MPG Dra.
José Clementino

Maura Souza
Prof. Dr^a. Maura Borges de Lima Dias e Souza
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação
em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro
IPTSP/UFV

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: Fernanda Almeida Andrade

Orientadora: Carolina Rodrigues Costa Carvalho

Membros:

1. Carolina Rodrigues Costa Carvalho

2. Maria do Rosário Rodrigues Silva

3. Valéria de Oliveira

Data: 09/02/2017

Dedicatória

Àqueles que são meu bem maior nesta terra e bênçãos de Deus em minha vida, ao meu marido Edi, e aos meus pais Evando e Eliana.

AGRADECIMENTOS

A Deus que por sua infinita graça me concedeu a oportunidade de chegar ao final de mais essa etapa da minha vida, permitindo-me concluir esse mestrado.

Agradeço aos meus pais, Evando e Eliana, por sempre incentivar e apoiar todas as decisões importantes que eu fiz até hoje. Obrigada por vocês cuidarem de mim com tanto zelo e amor. Minhas conquistas só foram possíveis porque eu tenho vocês ao meu lado.

Ao meu marido Edi César, por me acompanhar há 8 anos e por participar sempre das minhas maiores realizações. Agradeço o companheirismo e toda palavra que me confortou quando precisei. Obrigada por sempre me fazer rir nos momentos de preocupação durante a realização deste trabalho.

A toda a minha família, que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho e finalização do mestrado. Especialmente aos meus irmãos Matheus, Lucas e Gabriel que sempre estiveram presentes nos momentos em família, os quais sempre me trouxeram mais alegria.

A professora Carolina Rodrigues por me orientar durante esses dois anos que se passaram, por toda atenção e dedicação que foi oferecida à mim.

A professora Maria do Rosário, por compartilhar sempre seu conhecimento com todos do laboratório de micologia, especialmente por fazer parte da banca de qualificação e da banca de defesa do mestrado.

A Maysa e ao Fábio que fizeram parte da banca de qualificação contribuindo ao máximo para o enriquecimento desta pesquisa.

Agradeço a toda equipe do laboratório de Micologia, especialmente aos amigos Andressa, Lucas, Vivianny, Thaísa, Fabyola e Hildene por toda colaboração direta ou indireta nesta pesquisa.

A professora Valéria de Oliveira por aceitar imediatamente fazer parte da banca examinadora de defesa, e por sempre colaborar com nossas pesquisas oferecendo a parceria do seu laboratório.

As professoras do laboratório de micologia do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública Lúcia e Orionalda, que colaboraram diretamente ou indiretamente para a realização deste trabalho.

A Universidade Federal de Goiás e ao Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública por toda estrutura física e pela oportunidade de cursar o mestrado em Biologia da Relação Parasito-Hospedeiro.

Agradeço a Fapeg e ao CNPq pelo incentivo financeiro ofertado durante todo o período de mestrado.

SUMÁRIO

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | INTRODUÇÃO/ REVISÃO DA LITERATURA | 8 |
| 1.1 | Aspectos gerais | 8 |
| 1.2 | <i>Candida</i> spp. e Candidíase | 8 |
| 1.3 | Fatores de virulência das espécies de <i>Candida</i> | 11 |
| 1.3.1 | Aderência | 12 |
| 1.3.2 | Formação de biofilme..... | 12 |
| 1.3.3 | Morfogênese | 13 |
| 1.3.4 | Enzimas hidrolíticas | 13 |
| 1.4 | Mecanismo de ação e resistência | 14 |
| 1.5 | Compostos com atividade antimicrobiana | 17 |
| 1.5.1 | Compostos naturais | 17 |
| 1.5.2 | Compostos sintéticos | 20 |
| 2 | JUSTIFICATIVA | 21 |
| 3 | OBJETIVO GERAL..... | 22 |
| 3.1 | Objetivos específicos..... | 22 |
| 4 | METODOLOGIA..... | 23 |
| 4.1 | Isolados | 23 |
| 4.2 | Compostos e antifúngicos | 23 |
| 4.3 | Teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> | 23 |
| 4.3.1 | Preparo do inóculo | 24 |
| 4.3.2 | Meio de cultura..... | 24 |
| 4.3.3 | Realização do teste..... | 24 |
| 4.3.4 | Leitura e interpretação dos resultados..... | 25 |
| 4.4 | Determinação da Concentração Fungicida Mínima..... | 25 |
| 4.5 | Cinética de crescimento/ Curva de morte..... | 26 |
| 4.6 | Doseamento do ergosterol | 26 |
| 4.7 | Avaliação da citotoxicidade | 28 |
| 4.8 | Análise estatística..... | 29 |
| 5 | RESULTADOS | 30 |
| 5.1 | Determinação do teste de suscetibilidade <i>in vitro</i> e da Concentração Fungicida Mínima..... | 30 |
| 5.2 | Cinética de crescimento/ Curva de morte..... | 32 |
| 5.3 | Doseamento de ergosterol | 33 |
| 5.4 | Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> | 35 |
| 5.4.1 | Atividade hemolítica | 35 |
| 6 | DISCUSSÃO | 37 |
| 7 | CONCLUSÕES | 42 |
| | REFERÊNCIAS..... | 43 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Etapas do processo de patogênese das infecções relacionadas a fatores de virulência das espécies de *Candida*. Hofs et al. 2016. 12
- Figura 2. Mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos, poliênicos e equinocandinas. Adaptado de Dodds Ashley et al. 2006. 15
- Figura 3. a) Representação da planta *Curcuma longa* L. mostrando suas folhas e flores. b) Rizoma da planta contendo o pó utilizado para comercialização. 18
- Figura 4. Estrutura química da curcumina evidenciando os grupos fenóis. Adaptado de Moran et al. 2016. 19
- Figura 5. Estrutura química de um derivado hidrazona. 20
- Figura 6. Esquema representativo da suscetibilidade *in vitro* usando o teste de microdiluição em caldo (CLSI 2008, 2012). 25
- Figura 7. Curva de crescimento de *C. albicans* 28367 comparando o crescimento do controle com o crescimento das leveduras após exposição à curcumina, N-acilhidrazona e fluconazol em concentrações de sub inibição até 2x CIM. 33
- Figura 8. Curvas de espectrofotometria UV (230-300 nm) dos esteróis de *C. albicans* 28367. A) Controle (a) e curcumina nas concentrações ($\mu\text{g/mL}$) 32 (b), 64 (c), 128 (d) e 256 (e). B) Controle (a) e curcumina na CIM 64 $\mu\text{g/mL}$ (b). 34
- Figura 9. Curvas de espectrofotometria UV (230-300 nm) dos esteróis de *C. Albicans* 28367. C) Controle (a) e N-acilhidrazona nas concentrações ($\mu\text{g/mL}$), 8 (b), 16 (c), 32 (d) e 64 (e). D) Controle (a) e N-acilhidrazona na CIM 16 $\mu\text{g/mL}$ (b). 34
- Figura 10. Curvas de espectrofotometria UV (230-300 nm) dos esteróis de *C. albicans* 28367. E) Controle (a) e fluconazol na CIM 2 $\mu\text{g/mL}$ (b). 35
- Figura 11. Hemólise de eritrócitos expressa em porcentagem após ação de curcumina e fluconazol em concentrações variando entre 0,5 a 2048 $\mu\text{g/mL}$. .. 35
- Figura 12. Hemólise de eritrócitos expressa em porcentagem após ação de N-acilhidrazona e fluconazol em concentrações variando entre 0,5 a 512 $\mu\text{g/mL}$. 36

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1. Levantamento de estudos epidemiológicos referentes a casos de candidíase da mucosa oral, candidúria e candidemia..... | 10 |
| Tabela 2. Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> de cepas padrão frente aos compostos morina, hesperetina, boldina, curcumina e N-acilhidrazonas..... | 30 |
| Tabela 3. Perfil de suscetibilidade <i>in vitro</i> de espécies de <i>Candida</i> sob ação dos compostos curcumina e N-acilhidrazona e sob ação do antifúngico fluconazol. 31 | |

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

| | |
|---------|--|
| ASD | Ágar Sabouraud dextrose |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> |
| ATP | Adenosina tri-fosfato |
| CFM | Concentração Fungicida mínima |
| CIM | Concentração Inibitória mínima |
| CIM50 | Concentração Inibitória Mínima em 50% dos isolados |
| CIM90 | Concentração Inibitória Mínima em 90% dos isolados |
| CLSI | <i>Clinical Laboratory Standards Institute</i> |
| CSD | Caldo Sabouraud dextrose |
| DHE | Dehidroergosterol |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| HIV | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> |
| MOPS | Ácido 3-N-morfolino-propanossulfônico |
| PBS | Tampão fosfato-alcalino |
| RENISUS | Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS |
| RPMI | <i>Roswell Park Memorial Institute</i> |
| SUS | Sistema único de saúde |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| UTI | Unidade de Terapia Intensiva |

RESUMO

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são denominadas candidíase e são consideradas doenças oportunistas com características superficiais e sistêmicas. Espécies de *Candida* podem desenvolver mecanismos de defesa aos principais antifúngicos disponíveis para uso clínico contra infecções, dificultando e limitando o tratamento. Produtos naturais podem ser fonte de compostos bioativos contra doenças infecciosas, como por exemplo a planta *Curcuma longa* Linn ou açafrão como é popularmente conhecida que apresenta em sua constituição o composto curcumina. Esse vegetal é utilizado em grande escala pela população como condimento alimentar e como medicamento natural contra doenças inflamatórias e doenças infecciosas. Os compostos sintetizados laboratorialmente têm sido de interesse em biotecnologia médica, entre esses, os derivados hidrazonas estão associados com atividade antimicrobiana incluindo antifúngica, antioxidante, antiparasitária, anticonvulsiva, analgésica, anti-inflamatória e antitumoral. Os objetivos deste trabalho foram determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM) dos compostos curcumina e N-acilhidrazona, e ainda verificar a curva de morte de *Candida*, quantificar o ergosterol e avaliar a hemólise de hemácias após ação de ambos compostos. Foram utilizados 20 isolados *Candida* spp. no teste de microdiluição em caldo para avaliação da CIM e CFM dos compostos. A curva de morte e doseamento de ergosterol foram verificados após tratamento de *C. albicans* ATCC 28367 com os compostos. Para avaliação da citotoxicidade destes compostos utilizou-se hemácias de carneiro. O composto curcumina apresentou valores de CIM entre 16 e 256 µg/mL e CFM entre 128 a valores maiores que 512 µg/mL. Para o derivado N-acilhidrazona os valores de CIM variaram de 2 a 128 µg/mL e a variação de CFM foi entre 256 a valores maiores que 512 µg/mL. Os compostos mostraram ação fungistática sobre a cinética de crescimento de *Candida* ao longo de 48 horas. O doseamento de ergosterol após contato com os agentes na CIM de 64 µg/mL da curcumina e 16 µg/mL de N-acilhidrazona mostrou-se reduzido em 29,56 e 53,57%, respectivamente. Os compostos apresentaram atividade hemolítica em concentrações a partir de 512 µg/mL. Os resultados observados neste trabalho evidenciam que curcumina e o derivado N-acilhidrazona apresentam propriedades antifúngicas promissoras.

ABSTRACT

Infections caused by yeasts of the genus *Candida* are called candidiasis and are considered opportunistic diseases with characteristics ranging from superficial to disseminate. *Candida* species may develop defense mechanisms to the major antifungal agents available for clinical use against infections, making it difficult and limiting treatment. Natural products can be a source of bioactive compounds against infectious diseases, such as the *Curcuma longa* Linn or saffron plant as it is popularly known that it has the compound curcumin. This vegetable is used in large scale by the population as food condiment and as natural medicine against inflammatory diseases and infectious diseases. Laboratory-synthesized compounds have been to interest in medical biotechnology, among which the hydrazone derivatives are associated with antimicrobial including antifungal, antioxidant, antiparasitic, anticonvulsive, analgesic, anti-inflammatory and antitumor activity. The objectives were to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of curcumin and n-acylhydrazone compounds, and also to verify the time-kill curve of *Candida*, to quantify ergosterol and to evaluate hemolysis of red blood cells after action of both compounds. Twenty isolates *Candida* spp. in the broth microdilution test for evaluation of the MIC and MFC of the compounds. The time-kill curve and ergosterol assay were checked after treatment of *C. albicans* ATCC 28367 with the compounds. To evaluate the cytotoxicity of these compounds sheep red blood cells were used. The compound curcumin showed MIC values between 16 and 256 $\mu\text{g/mL}$ and MFC between 128 and values greater than 512 $\mu\text{g/mL}$. For the n-acylhydrazone derivative the MIC values ranged from 2 to 128 $\mu\text{g/mL}$ and the MFC variation ranged from 256 to values greater than 512 $\mu\text{g/mL}$. The compounds showed fungistatic action on the growth kinetics of *Candida* over 48 hours. The determination of ergosterol after contact with the agents in MIC of 64 $\mu\text{g/mL}$ of curcumin and 16 $\mu\text{g/mL}$ of n-acylhydrazone was reduced by 29.56 and 53.57%, respectively. The compounds showed hemolytic activity at concentrations of 512 $\mu\text{g/mL}$. The results observed in this work show that the curcumin and the n-acylhydrazone derivative have promising antifungal properties.

1 INTRODUÇÃO/ REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Aspectos gerais

As infecções fúngicas vêm aumentando gradativamente nos últimos 30 anos, tornando-se um relevante problema de saúde pública (Lass-Flörl 2009). Muitas dessas infecções são responsáveis por elevadas taxas de morbidade e mortalidade, entre pacientes que apresentam comprometimento imunológico (Pinto et al. 2009; Pfaller & Diekema 2010; Bitar et al. 2014). As micoses causadas por leveduras do gênero *Candida* são de extrema importância clínica e estão entre aquelas que apresentam maior incidência (Silva et al. 2012). Esse gênero é objeto de estudo em vários países, incluindo o Brasil (Pongsiriwet et al. 2004; Passos et al. 2007; Wang et al. 2009; Costa et al. 2010; Nucci 2010; Fraisse et al. 2011; Ataidés et al. 2012; Sardi et al. 2013). O aumento da resistência dos microrganismos contra agentes antimicrobianos é uma das maiores preocupações entre cientistas e médicos, pois o arsenal de fármacos antifúngicos disponíveis para tratamento apresenta limitações, sendo necessário desenvolver novas terapias antifúngicas que apresentem eficácia e baixo custo (Orhan et al. 2010; Bostrom et al. 2012; Aneja et al. 2016).

1.2 *Candida* spp. e Candidíase

Espécies do gênero *Candida* são microrganismos comensais, que fazem parte da microbiota de pessoas hípidas. Essas leveduras colonizam com alta frequência o hospedeiro humano, sendo que cerca de 20 a 80% da população adulta saudável apresenta colonização do trato gastrointestinal. A colonização da mucosa bucal ocorre entre 20 a 40% das pessoas e entre as mulheres a colonização por *Candida* na região vaginal ocorre entre 20 a 30% (Soll 2002; Barbedo & Sgarbi 2010). Entretanto, existem alguns fatores que podem interferir na relação entre o microrganismo e o hospedeiro determinando a transição de leveduras comensais para patogênicas (Colombo et al. 2013; Gulati & Nobile 2016).

As infecções causadas por *Candida* são denominadas candidíase ou candidose, sendo consideradas doenças oportunistas com características clínicas que variam desde superficiais até invasivas e podem ocorrer com evolução aguda ou crônica (Barbedo & Sgarbi 2010; Sardi et al. 2013). As manifestações clínicas que acometem a pele e as mucosas tendem a ser mais brandas, porém acontecem

com alta frequência, prejudicando a qualidade de vida das pessoas, ao passo que as manifestações da candidíase vulvovaginal aparecem em aproximadamente 75% das mulheres em idade reprodutiva (Hofs et al. 2016). A forma mais grave da doença é denominada candidemia, esse quadro de candidíase é estabelecido devido a capacidade de disseminação do fungo através da corrente sanguínea para diferentes sítios anatômicos como pulmão, rins, coração e fígado, caracterizando uma infecção sistêmica, esse quadro clínico ocorre principalmente em pacientes imunodebilitados (Lin et al. 2012; Gulati & Nobile 2016; McCarty & Pappas 2016). As leveduras do gênero *Candida* estão entre os principais agentes etiológicos de infecções fúngicas invasivas, as quais são responsáveis por elevados índices de mortalidade e morbidade em todo o mundo (Pfaller & Diekema 2007; Lass-Flörl 2009; Khan et al. 2010; Arendrup 2013; Bitar et al. 2014).

Candida albicans é a espécie predominantemente relacionada aos quadros clínicos de candidíase tanto superficiais quanto invasivos (Kumar et al. 2009). A frequência de isolamento dessa espécie nos casos de infecções hematogênicas é de aproximadamente 40% em países da América Latina e de até 70% em alguns países da Europa (Pfaller & Diekema 2007; Silva et al. 2012). Embora *C. albicans* seja a mais comum, espécies não-*albicans* como: *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida parapsilosis* têm emergido como patógenos clinicamente importantes (Spolidorio et al. 2009; Barbedo & Sgarbi 2010; Silva et al. 2012; Colombo et al. 2013; Ishida et al. 2013; Quindos 2014; Sariguzel et al. 2015; Aneja et al. 2016).

C. tropicalis encontra-se entre as espécies mais isoladas de pacientes com câncer, neutropenia e em uso de antibióticos a longo prazo, além de estar relacionada comumente a infecções do sangue e do trato urinário (Nuci & Colombo 2007; Negri et al. 2012; Jiang et al. 2013). As infecções causadas por *C. parapsilosis* aumentaram significativamente em neonatos, em pacientes transplantados e naqueles que recebem nutrição parenteral (Trofa et al. 2008). Essa espécie tem sido isolada com frequência das mãos de profissionais da saúde (Pfaller & Diekema 2007) e, além disso, foi a mais prevalente causando candidíase ungueal nos casos diagnosticados em um estudo realizado por Ataídes et al. (2012). *C. glabrata* está entre as principais espécies isoladas de infecções hematogênicas nos Estados Unidos, com frequência em torno de 20 a 25% dos casos (Periroth et al. 2007; Pfaller & Diekema 2007; Mccarty & Pappas 2016). Essa espécie associa-se à severa

gravidade principalmente em casos de transplantados de medula óssea que apresentam complicações do quadro infeccioso (Barbedo & Sgarbi 2010). No Brasil e em países da América Latina, as espécies *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* em conjunto ocupam a segunda posição quanto a frequência de isolamento de agentes de candidíase (Nucci & Colombo 2007; Pfaller & Diekema 2007). Estudos epidemiológicos publicados entre os anos de 2000 e 2010 em diferentes países mostrando a porcentagem de ocorrência dessas espécies em casos de candidíase oral, candidúria e candidemia podem ser observados na Tabela 1.

Tabela 1. Levantamento de estudos epidemiológicos referentes a casos de candidíase da mucosa oral, candidúria e candidemia.

| Candidíase | Referências | Região/ País | Número de isolados | <i>C.albicans</i> (%) | <i>C.tropicalis</i> (%) | <i>C.parapsilosis</i> (%) | <i>C.glabrata</i> (%) |
|-----------------|--------------------------------|-----------------------------|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------------------|-----------------------|
| Candidíase oral | Gonzales Gravina et al. (2007) | Venezuela | 43 | 42.3 | 12.8 | 14.9 | 2.1 |
| | Martins et al. (2010 a,b) | Portugal | 53 | 79 | 4.8 | 6.5 | 4.8 |
| | Luque et al. (2009) | Argentina | - | 60.7 | 4.5 | - | 5.6 |
| Candidúria | Kauffman et al. (2000) | EUA | 530 | 51.8 | 7.9 | 4.1 | 15.6 |
| | Kobayashi et al. (2004) | Brasil | 45 | 35.5 | 22.3 | 11.1 | 8.8 |
| | Passos et al. (2005) | Brasil | 68 | 69.1 | 2.9 | 5.8 | 7.4 |
| | Binelli et al. (2006) | Brasil | 23 | 52 | 43.5 | - | 17.3 |
| | Chen et al. (2008) | Austrália | 65 | 85.2 | - | 4.4 | 27.8 |
| | Álvarez-Lerma et al. (2003) | Espanha | 389 | 68.4 | 36 | 0.5 | 8.2 |
| | Dorko et al. (2002) | Eslováquia | 94 | 61.7 | 6.3 | 24.5 | - |
| Candidemia | Chakrabarti et al. (2009) | India | - | 26.3 | - | - | 10.5 |
| | Colombo et al. (2007) | Brasil | 282 | 38 | 48 | 23 | 9 |
| | Bassetti et al. (2006) | Itália | 182 | 40 | 9 | 23 | 15 |
| | Miranda et al. (2009) | Brasil | - | 42 | 33 | 16 | 2 |
| | Tortorano et al. (2006) | Europa | 473 | 53 | 7 | 14 | 14 |
| | Trick et al. (2002) | EUA | - | 59 | 10 | 11 | 12 |
| | Pfaller et al. (2010) | Europa/ Ásia/ América | 1239 | 50 | 9.8 | 17.4 | 17.4 |

Fonte: Silva et al. (2012).

As pessoas possuem mecanismos de proteção natural contra as injúrias, sendo que as barreiras de proteção primária compreendem a pele e mucosas íntegras, secreções e pH controlados, sistema imunológico competente e manutenção da microbiota autóctone (Gulati & Nobile 2016; McCarty & Pappas 2016). Fatores exógenos e endógenos exercem influência nos mecanismos de proteção natural dos indivíduos, de maneira que quando ocorre comprometimento das barreiras anatômicas as leveduras proliferam e concomitantemente o hospedeiro pode se tornar suscetível a infecção. O desequilíbrio parasito-hospedeiro estabelecido juntamente com a habilidade de algumas espécies de *Candida* expressarem fatores de virulência irão determinar o grau de patogenicidade das células fúngicas (Bizerra et al. 2008; Meer et al. 2010; Hofs et al. 2016). Dentre as condições inerentes ao hospedeiro que podem favorecer o aparecimento da infecção, pode ser citado a realização de procedimentos invasivos, terapia antimicrobiana prolongada, nutrição parenteral e utilização de cateteres (Ruhnke, 2006; Hofs et al. 2016). Pacientes transplantados, em tratamento quimioterápico (Tupe et al. 2013; Majewska et al. 2014; Criseo et al. 2015), e infectados pelo vírus HIV (*Human Immunodeficiency Virus*) apresentam maior suscetibilidade ao acometimento por espécies de *Candida* (Corti et al. 2013).

Associado aos fatores do microrganismo, mecanismos de virulência expressos pelo fungo como a formação de biofilme, capacidade de aderência em tecidos, a produção de enzimas hidrolíticas (proteases, fosfolipases, lipases e hemolisinas) durante a invasão tecidual, além da resistência aos antifúngicos se relacionam diretamente com a gravidade das infecções (Bliss et al. 2012; De Luca et al. 2012; Silva et al. 2012; Pakshir et al. 2013).

1.3 Fatores de virulência das espécies de *Candida*

Espécies de *Candida* podem se tornar patogênicas ao hospedeiro humano de acordo com sua capacidade em adaptar-se às alterações fisiológicas, favorecendo o processo de infecção (Naglik et al. 2003; Sariguzel et al. 2015).

Os principais determinantes de virulência envolvidos nos processos infecciosos causados por *Candida* são: aderência à superfície celular, formação de biofilme, morfogênese, produção e secreção de enzimas hidrolíticas (Figura 1) e resistência aos antifúngicos (Santana et al. 2013; Sardi et al. 2013). Esses fatores de virulência podem variar de acordo com o tipo, local e estágio da infecção.

Associações entre os fatores de virulência e as condições do hospedeiro podem potencializar a invasão das células nos tecidos (Naglik et al. 2003).

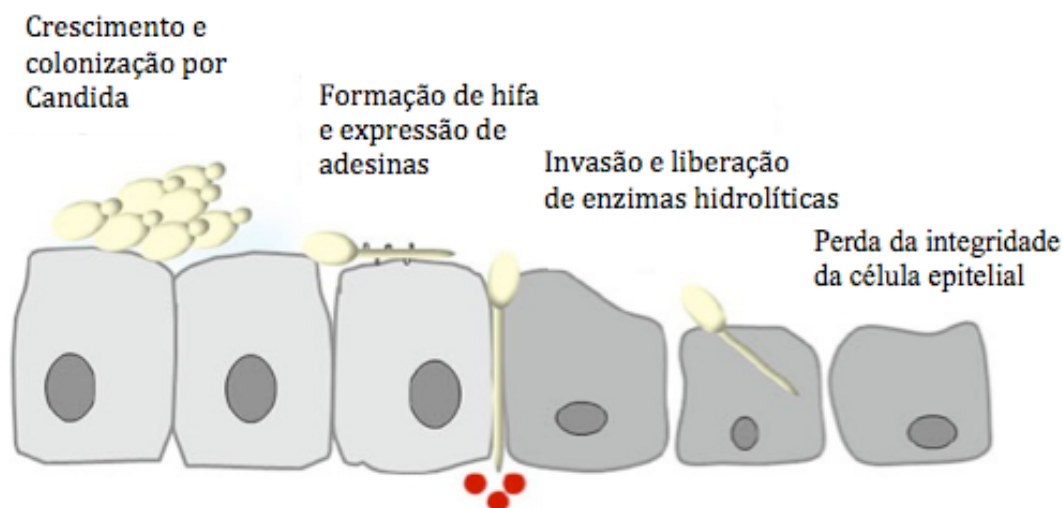


Figura 1. Etapas do processo de patogênese das infecções relacionadas a fatores de virulência das espécies de *Candida*. Hofs et al. 2016.

1.3.1 Aderência

A capacidade de aderência é o primeiro fator de virulência que as espécies de *Candida* apresentam para iniciar e estabelecer uma infecção (Silva et al. 2011). É mediada pela ligação de componentes específicos e interações não específicas. As adesinas, presentes na parede celular fúngica se ligam especificamente a moléculas que estão na superfície das células epiteliais do hospedeiro tais como lipídeos, polissacarídeos, glicoproteínas ou à componentes da matriz extracelular como fibrina, fibronectina, laminina e colágeno (Martinez & Fries 2010; Silva et al. 2011; Sardi et al. 2013). Como consequência da capacidade das leveduras aderirem às superfícies, ocorre a formação de uma comunidade multicelular que caracteriza o biofilme.

1.3.2 Formação de biofilme

Biofilmes são comunidades microbianas que apresentam organização e especificidade celular envolvidas em uma matriz exopolissacarídica e controlada por moléculas sinalizadoras. Constituem forma de proteção para o desenvolvimento das células fúngicas e permitem maior sobrevivência em condições desfavoráveis (Finkel & Mitchell 2011). A capacidade das leveduras de formar biofilmes está diretamente

ligada à potencialidade de causar infecções persistentes. Essas comunidades celulares estão associadas à resistência contra agentes antimicrobianos, pois devido à presença de matriz a penetração dos antifúngicos é limitada (Martinez & Fries 2010; Finkel & Mitchell 2011; Seneviratne et al. 2016).

A aderência com a consequente formação de biofilme pelas células fúngicas além de ocorrer nos tecidos do hospedeiro, pode ocorrer em dispositivos médicos como próteses, cateteres e sondas. Esses biofilmes representam um agravo na recuperação de pacientes, sendo a remoção cirúrgica e substituição do dispositivo médico a forma de tratamento indicado (Finkel & Mitchell 2011).

1.3.3 Morfogênese

O dimorfismo fúngico caracterizado pela transformação da forma leveduriforme para forma filamentosa ou vice-versa que as espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*, podem apresentar é outro fator que contribui para virulência dessas leveduras (Sardi et al. 2013).

Candida albicans quando comensal e não patogênica encontra-se, na maioria das vezes, na forma unicelular enquanto que as hifas e pseudo-hifas conferem capacidade invasiva e de patogenicidade. A forma filamentosa proporciona maior aderência às células humanas, e consequente aumento da resistência à fagocitose por macrófagos e neutrófilos devido a maior quantidade de adesinas na sua superfície (Thompson et al. 2011). Fatores extrínsecos como temperatura, pH e composição do meio onde as células estão inseridas podem influenciar nessa transição de morfologia (Mayer et al. 2013).

1.3.4 Enzimas hidrolíticas

As enzimas hidrolíticas desempenham função essencial na destruição dos tecidos do hospedeiro por *Candida* spp., são secretadas no local e auxiliam na adesão, penetração e invasão tecidual através da destruição das membranas e das mucosas devido à degradação de proteínas com valor estrutural que participam da resposta imunológica. Proteinases, fosfolipases e hemolisinas são as enzimas com maior implicação no potencial patogênico das leveduras (Silva et al. 2011). A função das fosfolipases é de degradar os fosfolipídeos presentes na membrana plasmática das células do hospedeiro enquanto as proteinases hidrolisam ligações peptídicas das proteínas, ambas ações enzimáticas facilitam o processo de aderência do

microrganismo e posterior invasão tecidual (Khan et al. 2010). O ferro é um elemento crucial para *Candida* spp., contribuindo para sua sobrevivência e capacidade de estabelecer infecções, para obtê-lo as leveduras são capazes de produzir hemolisinas, as quais provocam lise das hemácias do indivíduo permitindo a liberação desse mineral e captação pelas leveduras (Kumar et al. 2009).

1.4 Mecanismo de ação e resistência

Espécies de *Candida* podem desenvolver diferentes mecanismos de resistência aos principais antifúngicos disponíveis para uso clínico, essa resistência pode ser classificada em intrínseca (natural) ou adquirida (secundária) (Sanglard et al. 2009). Os mecanismos de defesa desenvolvidos pelas leveduras favorecem a persistência e progressão da doença mesmo quando a terapia antifúngica é realizada adequadamente (Kotaczkowska & Kotaczkowski 2016).

Existem três classes de antifúngicos utilizados no tratamento das candidíases, os quais atuam em componentes vitais para as células fúngicas. Duas dessas classes são os derivados poliênicos e os derivados azólicos que atuam na membrana celular fúngica, especificamente interferindo no ergosterol (Bailly et al. 2015). O ergosterol é o principal constituinte da membrana celular dos fungos e possui estrutura semelhante ao colesterol presente na célula humana, fato que desfavorece o tratamento das candidíases por ocasionar recorrente prejuízo ao hospedeiro. Esse esterol possui como função primordial biorregular a fluidez mantendo a integridade da membrana plasmática, além de garantir um funcionamento adequado das enzimas ligadas à membrana, e por esse motivo, a sua biossíntese é alvo para muitos antifúngicos (Odds et al. 2003; Carrillo-Munoz et al. 2006). A classe das equinocandinas também é bastante utilizada no tratamento das candidíases, atua no β -1,3 glucano que é um constituinte importante da parede celular (Bailly et al. 2015). O mecanismo de ação desses antifúngicos é apresentado na Figura 2.

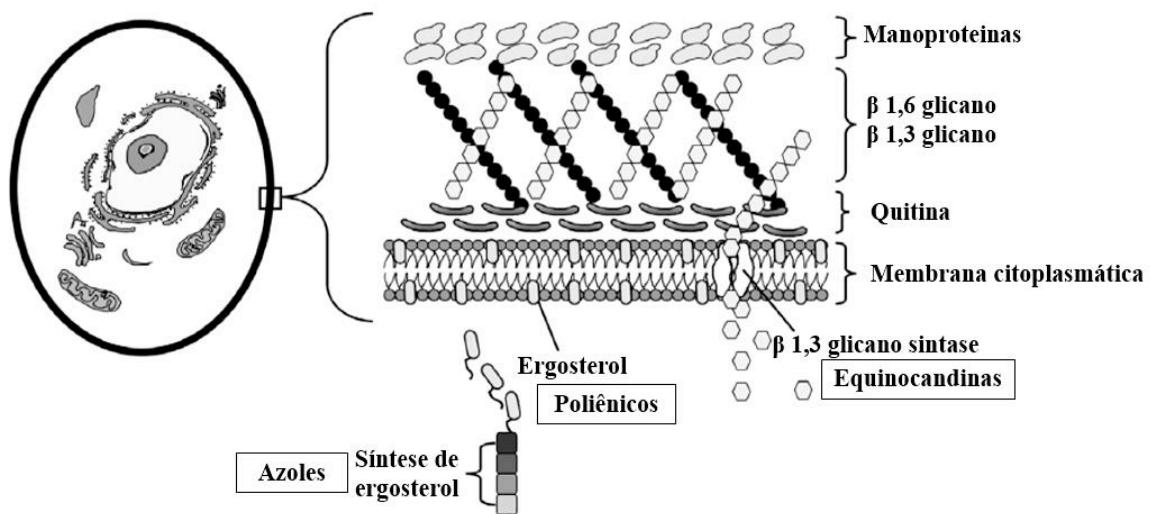


Figura 2. Mecanismo de ação dos antifúngicos azólicos, poliênicos e equinocandinas. Adaptado de Dodds Ashley et al. 2006.

O principal representante dos poliênicos é anfotericina B, sendo o antifúngico padrão para o tratamento das infecções fúngicas sistêmicas pois apresenta atividade fungicida de amplo espectro (Kathiravan et al. 2012). A atividade antifúngica desse fármaco é exercida por meio da sua ligação ao ergosterol através de interações hidrofóbicas, sua ação inicial é produzir poros na membrana com a finalidade de elevar sua permeabilidade e ocasionar perda de íons intracelulares, de forma que o resultado é um intenso desequilíbrio osmótico que interrompe a função da membrana induzindo a lise e morte das células fúngicas (Bendaha et al. 2011; Nett & Andes 2016). Embora a elevada atividade antifúngica de anfotericina B esteja comprovada, sua utilização está relacionada a muitos efeitos secundários por apresentar alta toxicidade. Os principais sintomas descritos por pacientes que necessitam fazer uso desse fármaco são relatados como: febre, calafrios, hepatotoxicidade e com frequência disfunção renal (Castro et al. 2006; Bendaha et al. 2011; Nett & Andes 2016).

Os antifúngicos azólicos são subdivididos em imidazólicos (clotrimazol, cetoconazol, miconazol) e triazólicos (fluconazol, voriconazol, itraconazol) com base na quantidade de átomos de nitrogênio presentes na estrutura química de cada um, sendo que os imidazólicos possuem dois átomos de nitrogênio e os triazólicos possuem três átomos (Pappas et al. 2009). Essa classe de fármaco é amplamente utilizada para o tratamento das infecções causadas por fungos, principalmente

contra infecções causadas por *Candida* spp (Favalessa et al. 2009). O mecanismo de ação dos derivados azólicos interfere na biossíntese do ergosterol por inibir a enzima lanosterol 14- α -demetilase, a qual é responsável pela demetilação do lanosterol em ergosterol. Essa alteração prejudica a formação correta do ergosterol resultando na formação de esteróis tóxicos, conseqüentemente as células fúngicas se tornam inviáveis devido a drásticas alterações que ocorrem na membrana plasmática (Carrillo-Munoz et al. 2006; Wang et al. 2009; Nett & Andes 2016).

Segundo Arendrup (2013) para os azóis são descritos basicamente três mecanismos de resistência microbiana: 1. Mutação no gene ERG11 responsável por codificar a enzima lanosterol 14- α -demetilase, provocando mudança na conformação da enzima e conseqüentemente perda de afinidade entre o antifúngico e a célula; 2. Mecanismo de competição entre fármaco e enzima, onde o antifúngico não consegue se ligar completamente a enzima lanosterol 14- α -demetilase devido a superprodução enzimática e 3. Redução da concentração intracelular do antifúngico devido a alterações nas bombas de efluxo, as quais expulsam o fármaco da célula fúngica inviabilizando sua ação.

As equinocandinas representam a classe de antifúngicos com a descrição mais recente, realizada em 2001. Micafungina, anidulafungina e caspofungina são representantes dessa classe, sendo o último o mais utilizado para terapia de candidíase. Seu mecanismo de ação interfere na inibição da síntese de β -1,3 glucano, constituinte importante da parede celular dos fungos. A interferência na formação da parede celular acarreta debilidade na proteção, equilíbrio, regulação e comunicação celular pois essas são as funções fundamentais da parede da célula fúngica (Carrillo-Munoz et al. 2006; Nett & Andes 2016).

A desvantagem dessa classe de fármacos é sua disponibilidade apenas em formulações parenterais, pois é uma via de administração que apresenta grande desconforto para os pacientes. Além disso, existe indicação de resistência adquirida de isolados de *Candida* frente às equinocandinas, envolvendo mutações em regiões do sítio alvo desses antifúngicos (Kotaczowska & Kotaczowski 2016).

Os fármacos disponíveis para o tratamento de Candidíase podem apresentar efeitos adversos como toxicidade e interações medicamentosas, além disso algumas espécies de *Candida* apresentam como fator de virulência resistência intrínseca aos principais antifúngicos (Bailly et al. 2015). Devido a isso terapias alternativas para essas micoses tornam-se necessárias para obter sucesso no tratamento. Nesse

contexto a utilização de compostos de plantas e compostos sintéticos com propriedades medicinais podem se tornar, com base em pesquisas, opções de tratamento das infecções causadas por *Candida* que apresentem boa resposta terapêutica e menos danos ao hospedeiro.

1.5 Compostos com atividade antimicrobiana

1.5.1 Compostos naturais

Produtos naturais são utilizados desde longa data pela população com finalidade terapêutica (Scorzoni et al. 2007; Petrovska 2012). As plantas destacam-se por possuírem muitos constituintes e metabólitos secundários que apresentam atividade contra inúmeras enfermidades, incluindo doenças infecciosas (Agra et al. 2007; Silva et al. 2009). Esses constituintes podem ser isolados e já são utilizados nas formulações medicamentosas para o controle de infecções fúngicas (Upendra et al. 2011; Moghadamtousi et al. 2014). O potencial antimicrobiano dos compostos, extratos e frações isolados de diferentes partes das plantas capaz de controlar o crescimento de uma ou mais espécies de microrganismos tem sido objeto de estudo em várias pesquisas (Silva et al. 2005; Gullece et al. 2006; Braga et al. 2007; Scorzoni et al. 2007; Maregesi et al. 2008; Lee et al. 2009; Martins et al. 2009; Mandalari et al. 2010; Dovigo et al. 2011; Khan et al. 2012; Ferreira et al. 2013; Costa et al. 2014; Baldwin et al. 2015; Reis et al. 2016).

Os compostos extraídos dos vegetais podem ser divididos em dois grupos: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários compreendem os carboidratos, aminoácidos, lipídeos e proteínas e são precursores para elaboração dos metabólitos secundários representados por compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, flavonoides e alcaloides (Kumar et al. 2015). Os compostos fenólicos, produzidos a partir do metabolismo secundário, são reconhecidos como agentes multifuncionais devido a sua ampla atividade biológica (Mandalari et al. 2010; Ferrazzano et al. 2011; Bisignano et al. 2013). Esses compostos podem ser divididos em fenóis ou polifenóis, determinados pela quantidade de grupamento fenol ligado à hidrocarbonetos aromáticos. Os grupos fenólicos se relacionam diretamente com propriedades benéficas à saúde, sendo conhecidos aproximadamente 8.000 compostos fenólicos encontrados em diversas plantas (Kumar et al. 2015; Dzialo et al. 2016).

Dentre as plantas que apresentam polifenóis, destaca-se a *Curcuma longa*

Linn (Figura 3a) pertencente à família Zingiberaceae, essa planta é nativa do Sul da Ásia e é conhecida popularmente como açafrão sendo utilizada em grande escala pela população, principalmente como condimento alimentar e como medicamento natural (Martins et al. 2009; Kumar et al. 2014; Negi et al. 2014; Cicero; Colleti 2016). Apresenta coloração amarelo-alaranjado brilhante, e sua comercialização é predominante na forma de pó (Figura 3b) (Martins et al. 2009; Moran et al. 2016). Esse vegetal possui tamanha importância que faz parte da relação nacional de plantas medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (Anand et al. 2010).

A *Curcuma longa L.* possui em seu rizoma três componentes fitoquímicos: curcumina (60%) sendo o constituinte principal, desmetoxicurcumina (22%) e bisdesmetoxicurcumina (18%). A curcumina foi isolada pela primeira vez em 1910 e desde então houve uma expansão do seu uso. É um composto polifenólico (Figura 4), classificado como curcuminóide, o qual possui atividade biológica de largo espectro com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antiproliferativas e antimicrobianas (Almeida et al. 2008; Gupta et al. 2013; Kumar et al. 2014; Moghadamtousi et al. 2014; Negi et al. 2014; Baldwin et al. 2015; Kim & Arnason 2015; Chen et al. 2016; Moran et al. 2016). Atividade antifúngica do composto curcumina já foi descrita contra espécies de *Candida*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus* spp. e *Sporothrix schenckii* (Martins et al. 2009; Sharma et al. 2010; Kumar et al. 2014; Chen et al. 2016). Além disso, esse constituinte apresenta efeitos contra doenças crônicas, diabetes mellitus, alergias e doença de Alzheimer (Moran et al. 2016).

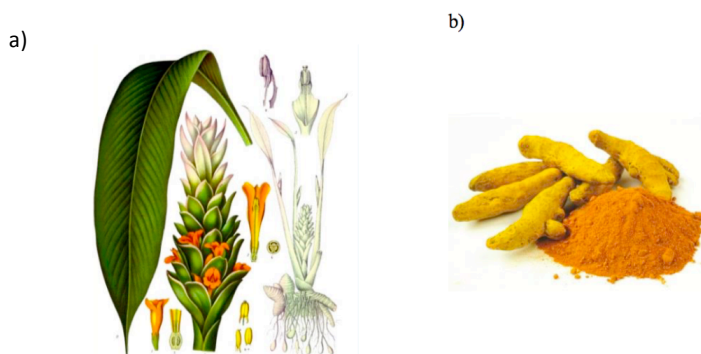


Figura 3. a) Representação da planta *Curcuma longa L.* mostrando suas folhas e flores. b) Rizoma da planta contendo o pó utilizado para comercialização.

O mecanismo de ação do composto natural curcumina ainda não está bem elucidado, sugere-se várias vias de ação incluindo alterações na atividade ATPase da membrana fúngica, na biossíntese de ergosterol e secreção de proteases (Kumar et al. 2014; Chen et al. 2016). A administração de curcumina tem se mostrado segura para uso, sendo que em pesquisas *in vivo* esse composto apresentou boa tolerabilidade e baixa toxicidade (Dudhatra et al. 2012; Gupta et al. 2012; Ghosh et al. 2015).

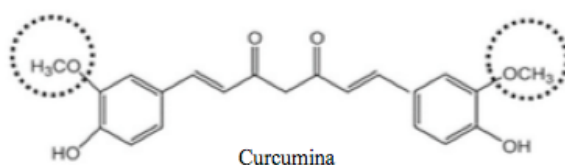


Figura 4. Estrutura química da curcumina evidenciando os grupos fenóis. Adaptado de Moran et al. 2016.

Os alcaloides representam outra classe de metabólitos secundários produzidos pelos vegetais. Boldina é uma representante dessas substâncias sendo encontrada majoritariamente nas folhas e nas cascas da árvore *Peumus boldus* (Brien et al. 2006). Essa planta é uma espécie arbórea pertencente à família Monimiaceae, nativa das regiões central e sul do Chile e conhecida como boldo no Brasil, suas folhas são largamente empregadas para tratamento de disfunções hepáticas e digestivas, pois apresentam muitas substâncias bioativas (Ruiz et al. 2008). Esse metabólito possui atividades antioxidantes, anti-inflamatórias e antipiréticas comprovadas (Passone & Etcheverry 2014). Além do constituinte boldina possuir ação medicinal, o óleo essencial de *P. boldus* apresenta atividade fungistática contra *Aspergillus* spp., e fungicida contra espécies de *Candida* mostrando que essa espécie vegetal possui propriedades farmacologicamente ativas (Lima et al. 2006; Bluma et al. 2008).

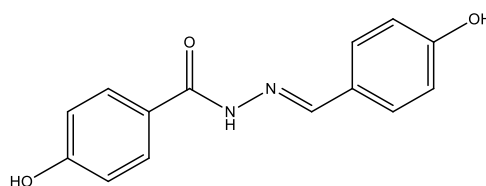
Hesperetina e morina são representantes da classe dos flavonoides que apresentam propriedades biológicas anti-inflamatória, antimicrobiana e anti-oxidante (Serrão et al. 2011; Sun et al. 2012; Ding & Peng 2015). Hesperetina pode ser isolada especificamente a partir de cascas de frutas cítricas como laranja (*Citrus aurantium*) e limão (*Citrus Limon*) (Coutinho et al. 2009; Serrão et al. 2011). O

flavonoide morina pode ser encontrado em vegetais utilizados na alimentação humana como no *Lepidium sativum* (agrião) e também empregados para uso medicinal (De Martino et al. 2012). Os flavonoides representam uma classe de metabólitos secundários biossintetizados pela maioria das plantas de maneira natural ou como forma de proteção, são compostos encontrados em frutas, sementes, cascas de árvores, raízes, caules e flores (Orhan et al. 2010; Sun et al. 2012; Kumar et al. 2015). Possuem uma variedade de ações, e são um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural (Dornas et al. 2007; Coutinho et al. 2009; Orhan et al. 2010).

1.5.2 Compostos sintéticos

Os estudos de novas classes de substâncias vêm sendo impulsionados pela necessidade de novos fármacos para tratar infecções (Rollas & Kuçukguzel 2007). Dessa forma, os compostos sintetizados laboratorialmente têm emergido como fator de interesse em biotecnologia médica, entre esses compostos os derivados hidrazonas são promissores devido as suas propriedades biológicas (Kajal et al. 2014).

As hidrazonas são compostos sintéticos, classificados como iminas, obtidos a partir da reação de condensação de derivados hidrazinas com aldeídos ou cetonas. As moléculas de hidrazonas se caracterizam por possuírem o grupo $-NH - N = CH-$ em sua estrutura (Figura 5) (Saeed et al. 2016). Esses derivados possuem aplicações na indústria, em sínteses orgânicas, como a de herbicidas, inseticidas e fertilizantes para plantas. Além disso, substâncias contendo hidrazonas estão associadas com atividade antimicrobiana, antioxidante, antiparasitária, anticonvulsiva, analgésica, anti-inflamatória e antitumorais (Rollas & Kuçukguzel 2007; Kajal et al. 2014; Verma et al. 2014).



(*E*)-4-hydroxy-*N'*-(4-hydroxybenzylidene)benzohydrazide

Figura 5. Estrutura química de um derivado hidrazona.

2 JUSTIFICATIVA

As infecções causadas por fungos vêm aumentando exponencialmente ao longo do tempo. Entre essas, as infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* ocorrem com elevada frequência, principalmente, devido ao aumento de indivíduos apresentando comprometimento imunológico (Pfaller & Diekema 2010). *Candida* spp. é capaz de estabelecer uma relação de comensalismo com o hospedeiro humano ao colonizar locais como mucosas e pele, porém quando ocorre desequilíbrio dessa interação as leveduras adquirem potencial patogênico podendo ocasionar manifestações clínicas agressivas (Colombo et al. 2013).

Dessa forma o tratamento eficaz contra candidíase é de extrema relevância, e associa-se ao diagnóstico precoce e ao uso de fármacos eficientes em todos os aspectos. Durante anos o tratamento das micoses limitou-se ao uso dos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e itraconazol que apesar de mostrarem eficácia apresentam muitas limitações, e mesmo com o progresso da indústria de medicamentos e a introdução de outros derivados azólicos e equinocandinas no mercado a terapia adequada de candidíase é necessária (Bailly et al. 2015).

Diante das dificuldades impostas pelo surgimento da resistência microbiana e os efeitos adversos como toxicidade dos fármacos, pesquisas vêm sendo conduzidas buscando terapias alternativas para o tratamento de candidíase. Do ponto de vista histórico, os produtos naturais sempre desempenharam um papel muito importante no processo de desenvolvimento de fármacos. A utilização de plantas com potencial medicinal é reconhecida pela Organização Mundial da Saúde por possuir vários benefícios, tais como reduzida ocorrência de efeitos colaterais e custo reduzido do tratamento (Anand et al. 2010).

Alguns vegetais apresentam constituintes ligados à ação antimicrobiana, entre eles destaca-se a curcumina, composto natural, que se encontra em fase de ensaios com grandes perspectivas para introdução na lista de opções para curar doenças causadas por fungos. Além dos compostos naturais, compostos sintéticos como o derivado acilhidrazona apresenta grande potencial antimicrobiano abrindo perspectiva para novos esquemas terapêuticos contra candidíase.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antifúngica dos compostos naturais morina, hesperetina, boldina, curcumina e de quatro compostos sintéticos N-acilhidrazonas com diferentes pesos moleculares de 256, 286, 272, 216 frente a leveduras pertencentes ao gênero *Candida*.

3.1 Objetivos específicos

3.1.1. Determinar a concentração inibitória mínima dos compostos naturais morina, hesperetina, boldina, curcumina e dos derivados sintéticos N-acilhidrazonas (256, 286, 272, 216 μM) frente à isolados do gênero *Candida*.

3.1.2. Determinar a concentração fungicida mínima dos compostos frente à espécies de *Candida*.

3.1.3. Avaliar a interferência dos compostos curcumina e N-acilhidrazona sobre a cinética de crescimento de *Candida*.

3.1.4 Determinar se os compostos curcumina e N-acilhidrazona são capazes de inibir a produção de ergosterol de *Candida*.

3.1.5 Avaliar a citotoxicidade *in vitro* dos compostos sobre hemácias de carneiro.

4 METODOLOGIA

4.1 Isolados

Foram utilizados 20 isolados de *Candida* procedentes da micoteca do Laboratório de Micologia da Universidade Federal de Goiás (UFG), sendo 08 *C. albicans*, 10 *C. parapsilosis*, 01 *C. tropicalis*, 01 *C. albicans* ATCC 28367. As espécies de *Candida* foram previamente identificadas em pesquisas anteriores utilizando-se métodos bioquímicos e morfológicos como crescimento em meio CHROMagar, produção de clamidoconídios e técnica de assimilação de hidratos de carbono e nitrogênio (Kurtzman et al. 2011).

4.2 Compostos e antifúngicos

Os compostos utilizados nesta pesquisa são procedentes do Laboratório de Bioconversão da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás cedidos pela professora Dra. Valéria de Oliveira. Inicialmente foi realizada uma triagem com oito diferentes compostos: morina, hesperetina, boldina, curcumina e quatro n-acilhidrazonas com diferentes pesos moleculares (256, 286, 272, 216 μM). Os testes da triagem foram realizados com duas cepas padrão de *Candida albicans* ATCC 90028 e ATCC 28367. A partir dos resultados obtidos com a realização da triagem foram selecionados dois compostos que apresentaram maior capacidade de inibir o crescimento fúngico: N-acilhidrazona com peso molecular 256 μM e curcumina para realização dos testes subsequentes. Todos os compostos foram primeiro solubilizados em dimetilsulfóxido (DMSO) (1% volume final) (CLSI 2008). A solução de “uso” foi preparada no dia da realização do teste de forma a obter uma concentração inicial de 1024 $\mu\text{g/mL}$. Fluconazol foi usado como controle em concentrações que variaram de 64 a 0,03 $\mu\text{g/mL}$, preparando-se uma solução estoque em RPMI 1640, a qual foi armazenada a -70°C até a realização do teste de suscetibilidade *in vitro*.

4.3 Teste de suscetibilidade *in vitro*

A suscetibilidade dos isolados frente aos compostos foi determinada de acordo com o teste de microdiluição em caldo, padronizado pelo documento M27-A3 e M27S4 definidos pelo CLSI (CLSI, 2008, 2012). As concentrações inibitórias mínimas dos compostos foram determinadas a partir da avaliação em diluições

seriadas.

4.3.1 Preparo do inóculo

Os inóculos foram preparados a partir das colônias de leveduras cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (ASD) por 24 horas a 35°C. Uma suspensão foi preparada em salina esterilizada a 0,85% e a densidade celular medida em espectrofotometria para uma transmitância de 85%, com o objetivo de obter aproximadamente 1×10^6 células/mL em comprimento de onda de 530 nm. Essa suspensão foi posteriormente diluída a 1:20 e 1:50 em RPMI 1640 de modo que a concentração final do inóculo foi de 0,5 a $2,5 \times 10^3$ células/mL. Os isolados de *Candida* utilizados para o preparo da suspensão foram subcultivadas por duas vezes para assegurar a pureza e viabilidade da levedura.

4.3.2 Meio de cultura

Foi utilizado o meio RPMI 1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio, suplementado com 2% de glicose, tamponado com 0,165 mol/L de ácido 3-N-morfolino-propanossulfônico (MOPS) para pH 7.0, esterilizado por filtração e armazenado a 4°C até a utilização.

4.3.3 Realização do teste

Foram utilizadas placas de microtitulação contendo 96 poços onde na primeira fileira da placa foram adicionados 200 µL do composto ou do antifúngico utilizado como controle. Na segunda fileira em diante foram adicionados 100 µL de caldo RPMI, sendo que diluições seriadas ao dobro dos compostos foram realizadas retirando-se 100 µL da primeira fileira e passando aos demais poços até a décima coluna. Posteriormente, 100 µL do inóculo a ser testado foram adicionados em todos os orifícios da placa com exceção dos controles. Controles de crescimento do inóculo, de esterilidade do meio e da solução dos compostos foram realizados em todos os ensaios. *Candida parapsilosis* ATCC 22019 foi utilizada como controle de qualidade, de acordo com o esquema na Figura 4. As placas foram incubadas a 35°C para posterior leitura do teste.

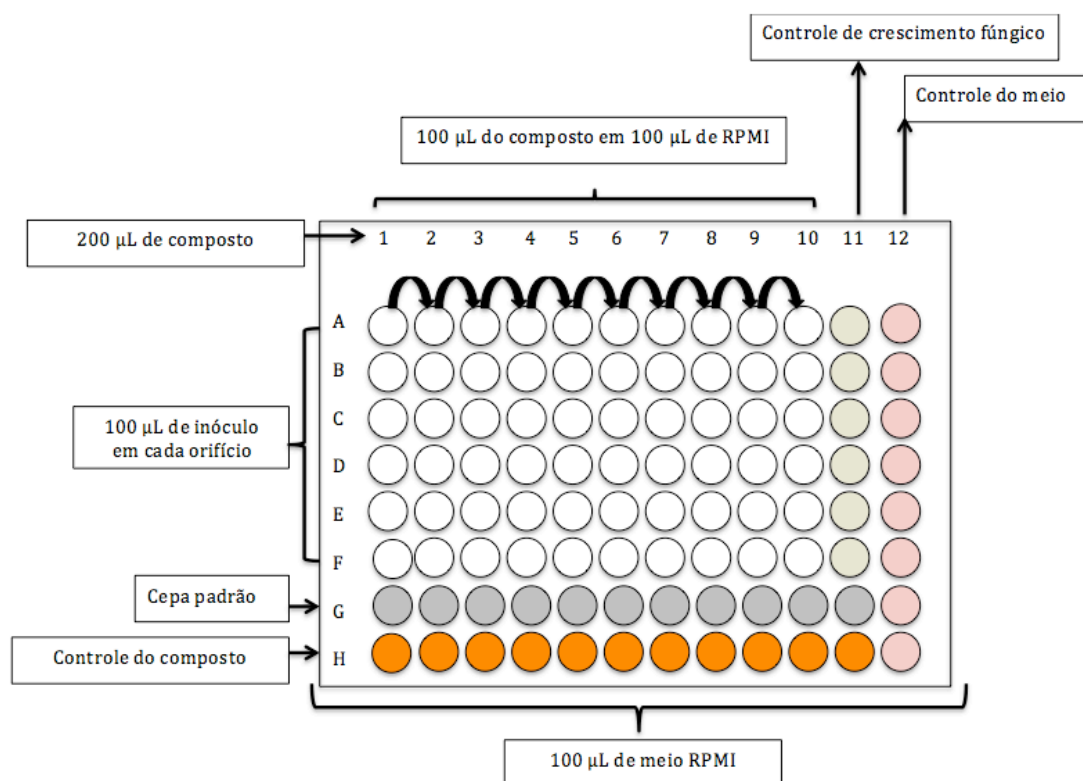


Figura 6. Esquema representativo da suscetibilidade *in vitro* usando o teste de microdiluição em caldo (CLSI 2008, 2012).

4.3.4 Leitura e interpretação dos resultados

As placas foram submetidas à leitura visual após 24 e 48 horas depois da realização do teste e comparado ao controle de crescimento do inóculo (meio de cultura e fungo), visualizando a turvação em cada orifício. A CIM foi considerada a menor concentração do composto ou fármaco capaz de inibir o total crescimento do fungo em relação ao inóculo.

4.4 Determinação da Concentração Fungicida Mínima

A determinação da CFM foi realizada a partir do teste de microdiluição em caldo, de onde foram retirados 10 µL de solução contidos nos orifícios nas concentrações correspondentes à CIM, 2x e 4x CIM e inoculados em placa de Petri contendo ASD. Após 24 e 48 horas de incubação a 35°C a CFM foi definida como a menor concentração em que não houve crescimento fúngico ou que resultou no crescimento de até duas colônias, representando a morte de mais de 99% do inóculo original (De Logu et al. 2005).

4.5 Cinética de crescimento/ Curva de morte

O ensaio para determinar a cinética de crescimento é fundamentado pela contagem de células viáveis de leveduras na presença do composto em intervalos periódicos de incubação. Esse método é denominado curva de morte fúngica e foi realizado de acordo com Klepser et al. (1997) e Lemos et al. (2009) com modificações.

Para o estudo da ação dos compostos curcumina e N-acilhidrazona sobre *Candida* utilizou-se a cepa padrão *C. albicans* ATCC 28367, cultivada em ASD por 24 horas antecedentes ao teste a 35⁰C. O inóculo foi obtido pela diluição em salina (0,85%) esterilizada, sendo as suspensões ajustadas por espectrofotômetro a uma transmitância de 85% ao comprimento de onda de 530 nm a fim de conter aproximadamente 10⁶ UFC/mL. Posteriormente, realizou-se diluição 1/10 em caldo Sabouraud (CSD) para obter 10⁵ UFC/mL e assim repetiu-se a mesma diluição até alcançar aproximadamente 10² UFC/mL. A suspensão preparada acrescida de CSD foi adicionada de curcumina e N-acilhidrazona em concentrações sub-inibitórias (1/2), CIM, concentrações 2x e 4x superiores a CIM. Foi preparado o controle do teste com a suspensão fúngica acrescida de CSD, alíquotas de 10 µL dessa suspensão foram plaqueadas em ASD e incubadas a 35⁰C, de maneira que esse plaqueamento foi considerado o T0. Os tubos contendo as diferentes concentrações do composto e as suspensões foram plaqueados no T0 e posteriormente incubados sob agitação a 200 rpm por 48 horas a 35⁰C. Após tempos de incubação pré-determinados de 3,6,12, 24, e 48 horas semeou-se 10 µL em placas de petri com ASD da mesma maneira que o controle. Fluconazol em concentrações similares aos dos compostos foi utilizado para o teste de verificação da curva de morte.

Esse ensaio foi realizado em duplicata e a média da contagem de colônias (em log₁₀ UFC/mL) de cada diluição em diferentes tempos foram inseridas em um gráfico em função do tempo, o qual permitiu a comparação entre os diferentes tratamentos com o composto.

4.6 Doseamento do ergosterol

Para a realização da dosagem lipídica, o ergosterol foi extraído conforme o Método de Quantificação de Esterol (MQE) descrito por Arthington-Skaggs et al. (1999) com algumas modificações. Uma colônia fúngica de *C. Albicans* ATCC 28367

crescida em ASD foi inoculada em erlenmeyers contendo 50 mL de CSD na presença dos compostos curcumina e n- acilhidrazona e de fluconazol (controle positivo), em concentrações sub-inibitórias (1/2) das leveduras, de inibição e em concentrações 2x e 4x superiores a CIM. Todos os erlenmeyers foram incubados por 48 horas em agitação de 200 rpm a 35°C. O controle negativo foi realizado com leveduras sem adição de composto.

A suspensão de células foi transferida para tubos falcon e centrifugada a 6000 rpm durante 5 min. A massa de células foi precipitada e o sobrenadante descartado para pesagem do tubo e determinação do peso do pellet obtido.

Ao sedimento formado adicionou-se 3 mL de solução alcoólica de potássio (25 g de hidróxido de potássio, 35 mL de água destilada e álcool 100% quantidade suficiente para 100 mL). As suspensões das células foram agitadas por 1 min e incubadas em banho maria a 85°C por 1 hora. Após o resfriamento em temperatura ambiente 24°C, o esterol foi extraído pela adição de 1 mL de água destilada esterilizada e 3 mL de n-heptano seguida de agitação vigorosa em vórtex por 3 min. Os tubos falcon foram deixados em repouso e verificou-se a formação da fase aquosa constituída por água e resíduos celulares, e da fase lipofílica formada pelo heptano saturado em água e ergosterol. A porção apolar contendo os esteróis formada na parte superior foi transferida para tubos de ensaio e armazenados a -20°C por 24 horas. Essa fração foi diluída em álcool 100% (1/5) e analisadas em espectrofotometria de varredura em um intervalo de 230 a 300 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata.

Essa técnica possibilita a extração de dois esteróis: ergosterol e 24(28)-dehidroergosterol (DHE) que é um componente da cascata bioquímica de formação do ergosterol. Tanto o ergosterol quanto 24(28)-DHE são absorvidos a 281,5 nm, enquanto que apenas 24(28) DHE mostra uma intensa banda de absorção em 230 nm. A porcentagem de ergosterol foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$(1) \quad \% \text{ Esteróis} = [(A_{281.5} / 290) \times F] / \text{peso pellet}$$

$$(2) \quad \% \text{ 24(28)-DHE} = [(A_{230} / 518) \times F] / \text{peso pellet}$$

$$(3) \quad \% \text{ ergosterol} = (1) - (2)$$

Sabe-se que tanto o ergosterol quanto o 24(28)-DHE são absorvidos a 281.5 nm, a quantidade total desses esteróis produzida por um isolado pode ser

mensurada conforme a fórmula 1. Onde: F = fator de diluição do etanol (= 5); 290 = valor de E (em percentual por centímetro) determinado pelo ergosterol cristalino.

É conhecido também que apenas o 24(28)-DHE é absorvido a 230nm, logo sua presença é calculada a partir dos valores de absorbância obtidos neste espectro de absorção, conforme a fórmula 2. Onde: F = fator de diluição do etanol (=5); 518 = valores de E (em percentual por centímetro) determinado pelo 24(28)-DHE.

Logo, a quantidade de ergosterol produzida pode ser determinada subtraindo o total de esteróis produzidos do valor obtido apenas pelo 24(28)-DHE, representado pela fórmula 3.

4.7 Avaliação da citotoxicidade

A citotoxicidade dos compostos curcumina e N-acilhidrazona foi determinada através do ensaio de atividade hemolítica de acordo com He et al. (2007) com modificações. Para este ensaio utilizou-se 5 mL de sangue de carneiro contendo o anticoagulante EDTA, o sangue foi centrifugado por 10 min a 2000 rpm para obtenção das hemácias, logo após foi lavado uma vez com tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4. O pellet de hemácias obtido foi diluído em 20 mL de PBS (diluição 1:5). Concomitantemente, em tubos eppendorff o composto curcumina e N-acilhidrazona e o antifúngico fluconazol foram diluídos em tampão PBS pH 7,4 em concentrações que variaram entre 2048 a 16 $\mu\text{L/mL}$, 512 a 4 $\mu\text{L/mL}$ e 128 a 0,5 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente. Foi adicionado 50 μL da solução de hemácias em cada eppendorff e incubou-se a 37°C sob agitação durante 30 min. Após incubação os tubos foram centrifugados a 3000 rpm por 5 min e, 80 μL do sobrenadante de cada concentração foi transferido para os poços correspondentes da placa de microtitulação de 96 poços. Como controle positivo utilizou-se Triton x-100 diluído a 1% e como controle negativo foi utilizada solução de hemácias com PBS pH 7,4. Para determinação da absorbância de cada amostra foi utilizado espectrofotômetro com comprimento de onda de 450 nm. O experimento foi realizado em triplicata. A porcentagem de hemólise foi calculada pela seguinte equação:

$$\frac{(A_{450} \text{ da amostra tratada com o composto} - A_{450} \text{ amostra tratada com PBS})}{(A_{450} \text{ de solução triton X100 1\%} - A_{450} \text{ amostra tratada com PBS})} \times 100\%$$

4.8 Análise estatística

Para análise estatística dos dados referente à cinética de crescimento foi utilizado o programa GraphPad Prism 5.01 Software (San Diego, CA, EUA). A variação entre os grupos foi analisada utilizando o teste de análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Bonferroni. Foi estabelecida significância estatística de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Determinação do teste de suscetibilidade *in vitro* e da Concentração Fungicida Mínima

Entre os compostos avaliados na triagem, o composto curcumina e o derivado N-acilhidrazona (256 μM) mostraram os melhores valores de CIM frente as duas cepas de *Candida*, com intervalos de variações de 64 a 256 $\mu\text{g/mL}$ e 8 a 16 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Os resultados obtidos podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Perfil de suscetibilidade *in vitro* de cepas padrão frente aos compostos morina, hesperetina, boldina, curcumina e N-acilhidrazonas.

| Compostos | Varição de CIM frente as ATCC ($\mu\text{g/mL}$) |
|-----------------------|--|
| Morina | 512 – 512 |
| Hesperetina | >512 |
| Boldina | 512–512 |
| Curcumina | 64–256 |
| N-acilhidrazona (286) | 64-256 |
| N-acilhidrazona (256) | 8-16 |
| N-acilhidrazona (272) | >512 |
| N-acilhidrazona (216) | >512 |

Curcumina e N-acilhidrazona mostraram atividade antifúngica contra diferentes espécies de *Candida*, verificando-se para curcumina valores de CIM entre 16 e 256 $\mu\text{g/mL}$, sendo o maior valor de CIM encontrado frente ao isolado de *C. tropicalis*, enquanto o menor valor ocorreu frente ao isolado de *C. parapsilosis*. Na concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ a curcumina inibiu 35% (7/20) dos isolados. Para o derivado N-acilhidrazona os valores de CIM variaram entre 2 a 128 $\mu\text{g/mL}$, sendo que esse composto sintético apresentou o menor e o maior valor de CIM contra isolados de *C. parapsilosis*. N-acilhidrazona foi capaz de inibir 35% (7/20) dos isolados na concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$. A CFM da curcumina teve uma variação entre 128 a valores maiores que 512 $\mu\text{g/mL}$ enquanto a CFM da N-acilhidrazona variou entre 8 a valores maiores que 512 $\mu\text{g/mL}$. Esses valores de CIM e CFM comparados com os valores para fluconazol frente a esses mesmos isolados podem

ser verificados na Tabela 3. O valor de CIM para fluconazol frente a cepa ATCC 22019 utilizada como controle esteve dentro do limite recomendado pelo protocolo do CLSI (CLSI, 2008, CLSI 2012).

Tabela 3. Perfil de suscetibilidade *in vitro* de espécies de *Candida* sob ação dos compostos curcumina e N-acilhidrazona e sob ação do antifúngico fluconazol.

| Isolados (20) | Curcumina | | N-acilhidrazona | | Fluconazol |
|-------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | CFM ($\mu\text{g/mL}$) | CIM ($\mu\text{g/mL}$) | CFM ($\mu\text{g/mL}$) | CIM ($\mu\text{g/mL}$) |
| <i>C. albicans</i> | | | | | |
| C.a. 127 | 64 | >256 | 64 | >256 | 1 |
| C.a. 320 | 64 | >256 | 64 | >256 | 0,125 |
| C.a. 258 | 128 | >512 | 64 | >256 | 2 |
| C.a. 280 | 128 | >512 | 16 | >64 | 1 |
| C.a. 138 | 128 | >512 | 8 | >32 | 64 |
| C.a. 173 | 128 | >512 | 8 | >32 | 64 |
| C.a. 144 | 64 | >256 | 8 | >32 | 64 |
| C.a. 181 | 128 | >512 | 16 | >64 | 1 |
| ATCC 28367 | 64 | >256 | 16 | >64 | 2 |
| <i>C. parapsilosis</i> | | | | | |
| C.p. 157 | 32 | >128 | 16 | >64 | 1 |
| C.p. 31 | 32 | >128 | 4 | 8 | 0,25 |
| C.p. 112 | 32 | >128 | 16 | >64 | 2 |
| C.p. 38 | 64 | 128 | 128 | >512 | 0,5 |
| C.p. 190 | 64 | >256 | 2 | >8 | 2 |
| C.p. 15 | 32 | >128 | 16 | 64 | 0,5 |
| C.p. 187 | 64 | >256 | 64 | >256 | 0,125 |
| C.p. 106 | 32 | >128 | 16 | 32 | 1 |
| C.p. 77 | 16 | >64 | 2 | >8 | 0,5 |
| C.p. 120 | 32 | >128 | 4 | >16 | 2 |
| <i>C. tropicalis</i> | | | | | |
| C.t. 45 | 256 | 512 | 64 | 256 | 2 |

A CIM₅₀ para curcumina foi igual a 64 $\mu\text{g/mL}$ e para N-acilhidrazona foi igual a 16 $\mu\text{g/mL}$. A CIM₉₀ para curcumina apresentou o valor de 128 $\mu\text{g/mL}$ e para N-acilhidrazona foi igual a 64 $\mu\text{g/mL}$.

5.2 Cinética de crescimento/ Curva de morte

A cinética de crescimento de *C. Albicans* ATCC 28367 sob ação do composto curcumina nas concentrações equivalentes a ½ CIM (32 µg/mL) e CIM (64 µg/mL) apresentaram redução na contagem de colônias a partir de 3 horas de incubação quando comparadas com as células não expostas ao composto ($p < 0.05$), no entanto a partir de 12 horas de exposição à curcumina o número de unidades formadoras de colônias por mililitros manteve proximidade ao controle (células não expostas ao composto). Na concentração 2x CIM (128 µg/mL) de curcumina há redução do número de células a partir das primeiras horas de incubação, que se estende durante as 48 horas de incubação ($p < 0.05$). A cinética de crescimento das leveduras após tratamento com o composto N-acilhidrazona na concentração sub-inibitória (8 µg/mL) permaneceu próxima ao crescimento das leveduras sem tratamento ($p > 0.05$), enquanto que na CIM (16 µg/mL) e em 2x CIM (32 µg/mL) houve redução significativa ($p < 0.05$). Observa-se melhor inibição no número de unidades formadoras de colônias por mililitros entre 6 e 12 horas de incubação para este composto. O fluconazol nas concentrações sub-inibitórias (1 µg/mL), CIM (2 µg/mL) e 2x CIM (4 µg/mL) apresentou atividade fungistática durante o período total de incubação ($p < 0.05$). A curva de morte de *C. albicans* 28367 submetidas ao tratamento com os compostos curcumina e N-acilhidrazona convergiram para atividade fungistática, não atingindo o valor mínimo de 99,9% de redução celular, em comparação com o inóculo inicial, para serem considerados compostos fungicidas. A figura 5 apresenta os gráficos \log_{10} UFC/mL pelo tempo de exposição das leveduras aos compostos e ao fluconazol.

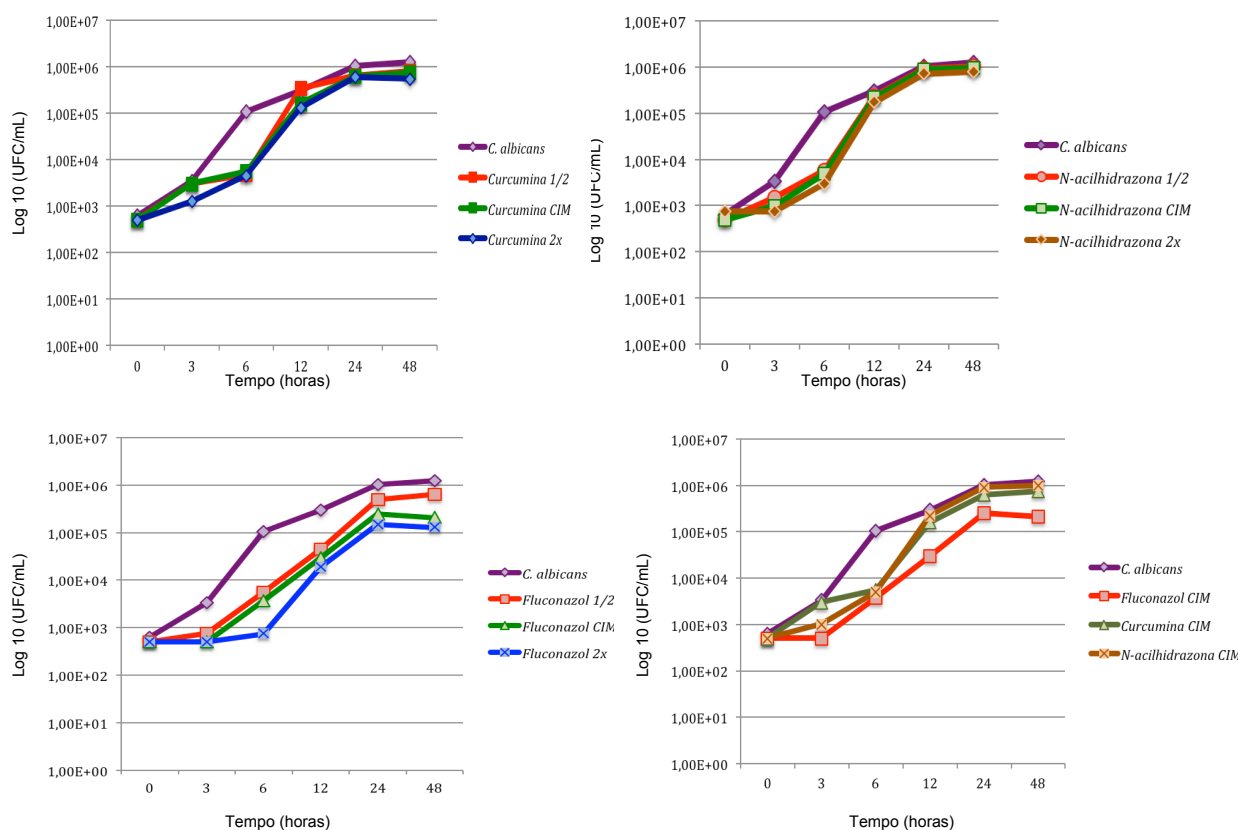


Figura 7. Curva de crescimento de *C. albicans* 28367 comparando o crescimento do controle com o crescimento das leveduras após exposição à curcumina, N-acilhidrazona e fluconazol em concentrações de sub inibição até 2x CIM.

5.3 Doseamento de ergosterol

A inibição da biossíntese do ergosterol avaliada por espectrofotometria mostrou que os compostos curcumina e N-acilhidrazona foram capazes de reduzir a concentração de ergosterol produzido por *C. albicans* ATCC 28367, quando comparados com o controle (células de *C. albicans* sem composto) que apresentou produção de ergosterol no valor de 0,01137. A redução da síntese de ergosterol promovida pelos compostos foi proporcional a concentração do composto. Para curcumina observou-se que na concentração sub-inibitória a inibição correspondeu a 26,1% (0,00841), na CIM houve redução de 29,56% (0,00801), em 2x CIM foi igual a 49,79% (0,00571) enquanto que em 4x CIM ocorreu a maior porcentagem de redução sendo de 73,18% (0,00305). Os perfis espectrofotométricos de curcumina em comparação com o controle negativo estão representados na figura 6.

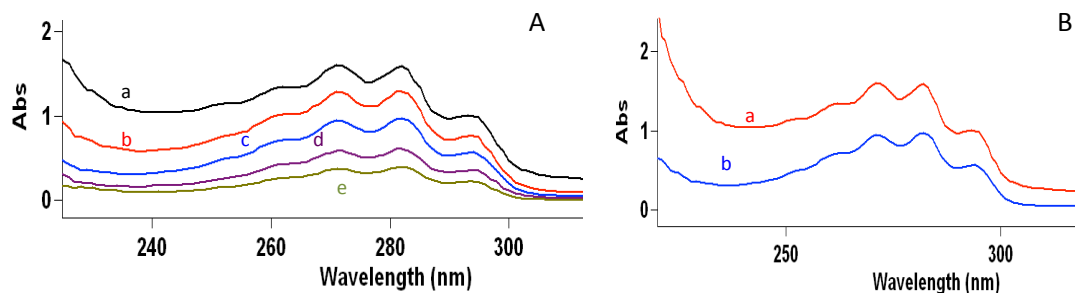


Figura 8. Curvas de espectrofotometria UV (230-300 nm) dos esteróis de *C. albicans* 28367. A) Controle (a) e curcumina nas concentrações ($\mu\text{g/mL}$) 32 (b), 64 (c), 128 (d) e 256 (e). B) Controle (a) e curcumina na CIM 64 $\mu\text{g/mL}$ (b).

O composto N-acilhidrazona mostrou inibir a produção de ergosterol de *C. albicans* efetivamente. Na concentração sub-inibitória apresentou redução de 40,29% (0,00679), em CIM de 53,57% (0,00528), em 2x CIM 59,8% (0,00458) e em 4x CIM a redução aproximou de 100% sendo igual a 93,83% (0,00702). Os perfis espectrofotométricos de N-acilhidrazona em comparação com o controle estão representados na figura 7.

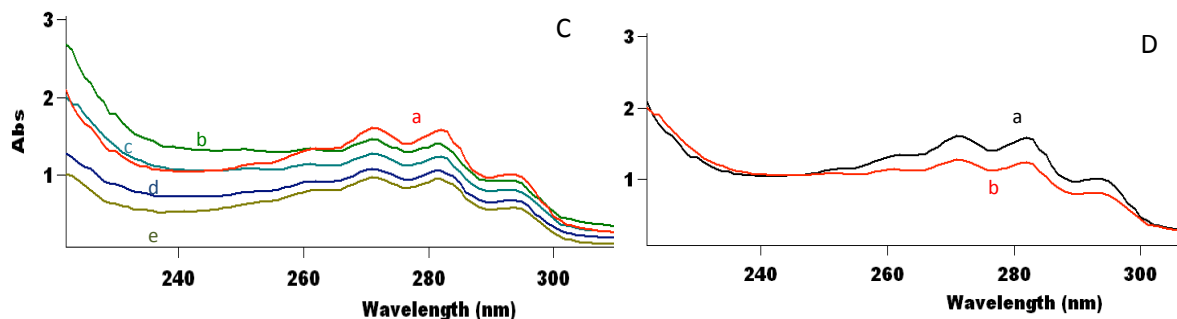


Figura 9. Curvas de espectrofotometria UV (230-300 nm) dos esteróis de *C. Albicans* 28367. C) Controle (a) e N-acilhidrazona nas concentrações ($\mu\text{g/mL}$), 8 (b), 16 (c), 32 (d) e 64 (e). D) Controle (a) e N-acilhidrazona na CIM 16 $\mu\text{g/mL}$ (b).

O perfil espectrofotométrico do fluconazol pode ser observado na figura 8, onde na CIM esse antifúngico mostrou 97% (0,0224) de inibição do ergosterol comparado com o controle negativo.

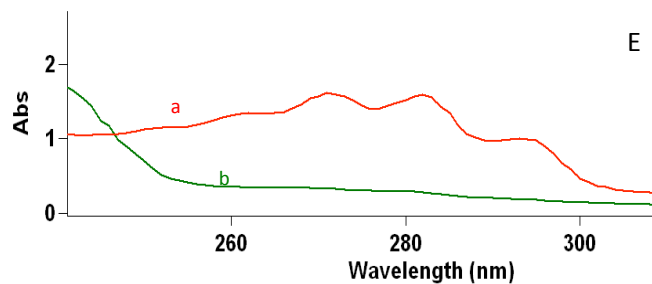


Figura 10. Curvas de espectrofotometria UV (230-300 nm) dos esteróis de *C. albicans* 28367. E) Controle (a) e fluconazol na CIM 2 µg/mL (b).

5.4 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

5.4.1 Atividade hemolítica

Os resultados do teste de citotoxicidade *in vitro* mostraram que o composto curcumina quando adicionado em hemácias de carneiro promoveu hemólise a partir da concentração de 512 µg/mL considerada 8x superior a CIM. Essa mesma concentração foi observada para o composto N-acilhidrazona promovendo lise nos eritrócitos, em concentração 32x superior a CIM. Para o antifúngico fluconazol observou-se que a partir da concentração de 64 µg/mL houve lise das hemácias. Nas figuras 9 e 10 são apresentadas as porcentagens de lise dos eritrócitos após tratamento com os compostos curcumina e N-acilhidrazona, respectivamente.

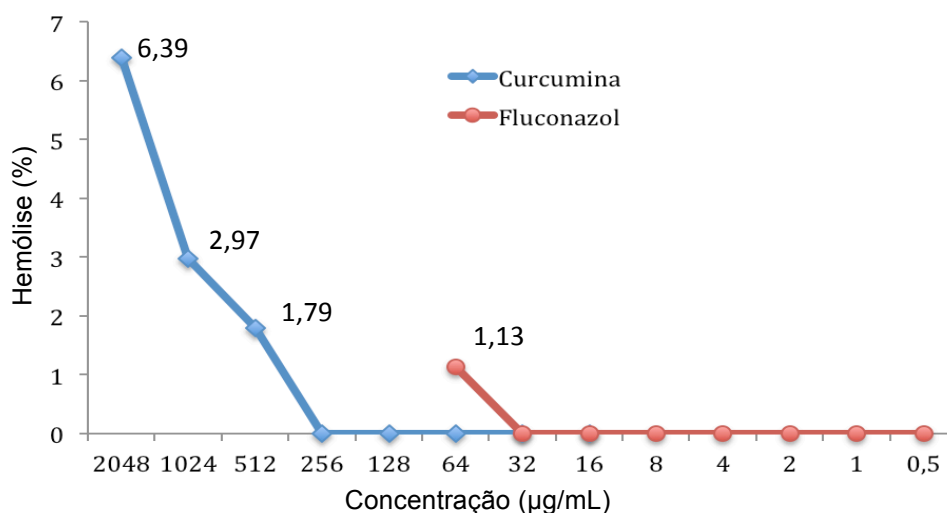


Figura 11. Hemólise de eritrócitos expressa em porcentagem após ação de curcumina e fluconazol em concentrações variando entre 0,5 a 2048 µg/mL.

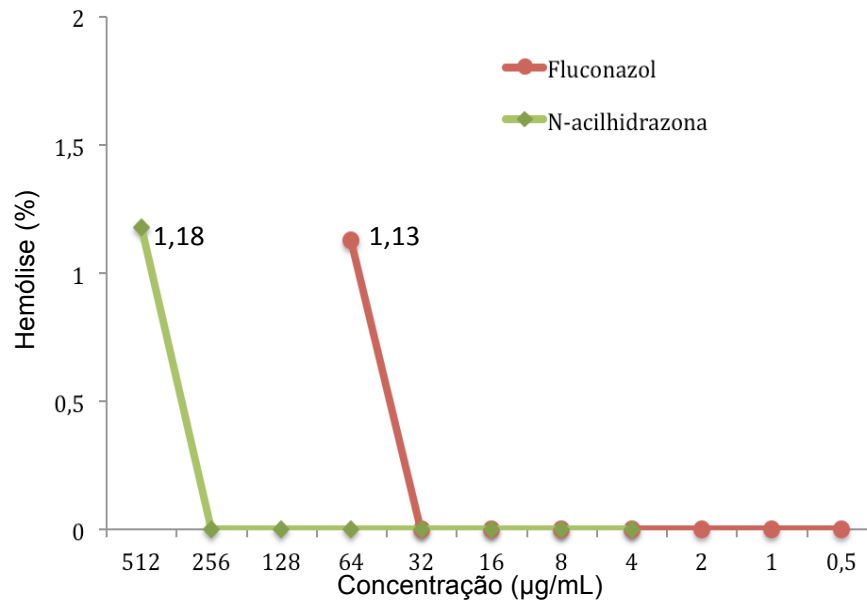


Figura 12. Hemólise de eritrócitos expressa em porcentagem após ação de N-acilhidrazona e fluconazol em concentrações variando entre 0,5 a 512 µg/mL.

6 DISCUSSÃO

As plantas produzem uma variedade de compostos resultantes do seu metabolismo primário e secundário. Substâncias provenientes do metabolismo secundário como os polifenóis apresentam ampla atividade biológica, incluindo atividade antifúngica (Teodoro et al. 2015). A curcumina que é um composto polifenólico produzido pela *C. longa Linn* além de estar relacionada ao tratamento de diversas desordens da saúde, vem sendo associada à atividade contra infecções fúngicas (Dovigo et al. 2011a). Os compostos que podem ser sintetizados como a N-acilhidrazona são bastantes promissores quanto sua atividade biológica (Negi et al. 2012; Raitz 2012), e assim como verificado neste trabalho quanto à sua capacidade antifúngica. A investigação para avaliar a viabilidade e utilização desses compostos contra doenças fúngicas deve ser intensificada, a fim de aumentar as opções terapêuticas.

Para determinação da atividade antifúngica dos compostos, nesta pesquisa utilizou-se o método de microdiluição em caldo padronizado pelo *CLSI*. Os isolados fúngicos utilizados são pertencentes ao gênero *Candida*, por serem leveduras encontradas em indivíduos saudáveis, bem como estarem entre os patógenos fúngicos mais comuns causando infecções graves principalmente em pessoas imunodebilitadas (Endo et al. 2010). Esse método, é considerado efetivo, sensível e reprodutível (Mesa-Arango et al. 2009; Vila et al. 2013), além de ser uma técnica frequentemente utilizada para avaliar a sensibilidade de microrganismos à substâncias biologicamente ativas (Leite et al. 2007; Pinto et al. 2009; Endo et al. 2010; Khan et al. 2010; Zuzarte et al. 2012; Herkert et al. 2015; Mazari et al. 2015; Durdu et al. 2016). Dessa forma, essa técnica permitiu determinar a concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima dos compostos avaliados neste estudo.

A inibição do crescimento das leveduras pelo composto natural curcumina e pelo composto sintético N-acilhidrazona mostram a importância do nosso trabalho. Segundo Scorzoni et al. (2007), produtos vegetais com atividade antifúngica em concentrações inibitórias mínimas $\leq 250 \mu\text{g/mL}$ são considerados relevantes para a pesquisa de substâncias com finalidade terapêutica. Borges-Argaez et al. (2007) consideram que valores de CIM entre 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$ são aceitáveis, enquanto Aligiannis et al. (2001) sugerem como forte inibição CIM até 500 $\mu\text{g/mL}$, moderada

entre 600 e 1500 µg/mL e fraca inibição valores maiores que 1600 µg/mL. Logo, considerando os resultados obtidos para curcumina e N-acilhidrazona, cujas CIM foram ≤ 64 µg/mL para a maioria dos isolados de *Candida* spp, e de acordo com os critérios apresentados, a atividade antifúngica desses compostos representa forte inibição fúngica.

A atividade antifúngica da curcumina verificada neste trabalho corrobora com a pesquisa de Martins et al. (2009), na qual verificaram que esse composto apresentou inibição de isolados de espécies de *Candida*, *Paracoccidioides brasiliensis* e *Sporothrix schenckii* com variação de CIMs entre 32 a ≥ 256 µg/mL. Neefolar et al. (2011), demonstraram que esse polifenól apresentou atividade contra 14 cepas de *Candida* com CIMs variando entre 250 a 2000 µg/mL. Em outro estudo realizado por Khan et al. (2012) a atividade anti-*Candida* de curcumina foi demonstrada contra 38 diferentes cepas, incluindo algumas resistentes ao fluconazol. Atividade antimicrobiana também foi verificada por Negi et al. (2014) contra isolados de *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, estudos realizado por Dovigo et al (2013, 2011a,b) demonstraram que curcumina apresentou ser um composto fotossensibilizador de elevado potencial fungicida para terapia fotodinâmica, especialmente contra *Candida* spp. Essas pesquisas demonstram o significativo potencial antifúngico de curcumina.

Os compostos sintéticos, como os derivados hidrazonas, possuem uma grande variedade de atividades biológicas compreendendo atividade antimicrobiana e especificamente antifúngica (Altintop et al. 2012). Alguns pesquisadores sintetizaram e avaliaram a atividade biológica de diferentes hidrazonas, muitos demonstrando atividade contra espécies de *Candida*. Secci et al. (2012) desenvolveram um novo derivado de hidrazina (precursora da hidrazona) e avaliaram a atividade *in vitro* contra *Candida* que exibiu CIM de 0,25 µg/mL, da mesma maneira derivados hidrazinas foram sintetizados por Maillard et al. (2013) e relataram apresentar CIM de 0,25 µg/mL. Altintop et al. (2012) desenvolveram e avaliaram a atividade *in-vitro* de novos derivados hidrazonas, e relataram CIM de 0,05 µg/mL contra leveduras. Em nossa pesquisa a atividade contra espécies de *Candida* foi semelhante a esses trabalhos, com CIM de 16 µg/mL para 35% dos isolados. Afirmando o potencial antimicrobiano dos derivados hidrazonas, Kuçukguzel et al. (1999) demonstraram CIM igual a 32 µg/mL contra *Mycobacterium*

fortuitum, Tavares et al. (1999) relataram CIM variando entre 0.16-63 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* e Ulusoy et al. (2000) verificaram que derivados hidrazinas apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *Saphylococcus epidermidis* e atividade antifúngica contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum audounii* com variação de CIM de 0.24 a 25 µg/mL.

O método de curva de morte pode ser utilizado para a avaliação de novos agentes antimicrobianos, pois permite uma análise dinâmica da interação entre o agente antimicrobiano e o microrganismo, evidenciando utilidade clínica maior que determinações estáticas como a CFM (Pfaller et al. 2004). Neste trabalho, a cinética de crescimento de *C. albicans* após tratamento com curcumina apresentou redução significativa ($p < 0.05$) em todos os tempos analisados, mas não mostrou redução \geq que 99% das células, permitindo verificar ação fungistática desse composto. Corroborando com nossos resultados Khan et al. (2012) verificaram o efeito sobre o padrão de crescimento de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* na presença de curcumina, onde após 10 horas de incubação ocorreu uma diminuição significativa no crescimento fúngico, no entanto em comparação com o controle a redução foi igual a 50,27% não atingindo o valor para ser considerado fungicida, verificamos no presente estudo redução de 40,3% no número de células viáveis em 64 µg/mL de curcumina, ao final de 48 horas de incubação. A ação fungistática de curcumina foi verificada por Kumar et al. (2014), onde demonstraram que esse polifenól isoladamente em 256 µg/mL não afetou significamente o crescimento de *Candida* spp. Em nosso estudo, a curvas de fluconazol em 2 µg/mL teve redução $\leq 1 \log_{10}$ UFC/mL em comparação com a curva de controle apresentando ação fungistática, da mesma maneira essa ação foi verificada por Klepser et al. (1998) que demonstraram reduzida separação entre as curvas do inóculo inicial e as curvas de fluconazol.

Entre curcumina e N-acilhidrazona em suas respectivas CIMs, curcumina mostrou apresentar ação fungistática mais próxima do fluconazol, exibindo curvas paralelas a esse antifúngico. As pesquisas investigativas da interferência dos derivados hidrazonas sobre os microrganismos são escassas. Dessa forma, nosso trabalho apresentou resultados quanto a influência do composto N-acilhidrazona sobre a cinética de crescimento de *Candida* spp. demonstrando que apenas em $\frac{1}{2}$ CIM esse derivado não reduziu significamente o crescimento das leveduras

($p > 0.05$), devido ser essa a menor concentração desse composto.

O possível mecanismo de ação da curcumina e da N-acilhidrazona sobre a membrana plasmática foi analisado através da avaliação da interferência desses compostos na quantidade de ergosterol produzida por *C. albicans* ATCC 28367. O ergosterol é um importante componente da membrana celular dos fungos, assim, a quantificação desse esterol após exposição das células fúngicas aos compostos permitiu verificar se estes possuem mecanismo de ação similar aos azólicos, inibindo a síntese de ergosterol (Khan et al. 2010).

Desta forma, os nossos resultados de redução da síntese de ergosterol da célula fúngica submetida à ação de curcumina e N-acilhidrazona mostram que esses compostos são capazes de interferir na biossíntese desse lipídeo quando comparados com o controle, pois curcumina na CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de reduzir o ergosterol em 29,56% e N-acilhidrazona na CIM de 16 $\mu\text{g/mL}$ mostrou uma redução de 53,57% do ergosterol presente em *C. albicans*. A redução do conteúdo de ergosterol de *Candida* spp. após ação de curcumina foi verificada por Neelofar et al. (2010) que demonstraram uma redução de 70 e 53% de *Candida albicans* e *Candida glabrata* após exposição à curcumina. Dovigo et al. (2013) sugerem que o mecanismo antifúngico da curcumina pode estar relacionado com alterações das atividades ATPase da membrana plasmática, por meio de modificações na biossíntese de ergosterol ou com a secreção de proteinases. Sharma et al. (2012) sugeriram que o polifenól curcumina pode alterar a regulação genética relacionada ao ergosterol e a homeostase dos lipídeos da membrana. Estes estudos sugerem um mecanismo de ação para este composto associado à membrana, corroborando com nossos resultados.

O possível mecanismo de ação do derivado N-acilhidrazona não é reportado na literatura, o que constitui o presente estudo uma primeira análise desse composto. Verifica-se pelo método de doseamento de ergosterol que esse derivado apresentou melhor interferência na biossíntese do ergosterol quando comparado com a curcumina, em suas respectivas CIMs. Observa-se ainda que, em concentrações superiores a 16 $\mu\text{g/mL}$ a redução chega próximo a 100%, nossos resultados sugerem que um dos possíveis mecanismo de ação da N-acilhidrazona seja a redução da síntese de ergosterol.

O teste de citotoxicidade *in vitro* se encontra entre os primeiros ensaios para avaliação do comportamento de um fármaco em células semelhantes a humanas,

antecedendo os testes *in vivo*. Neste trabalho foi realizado o ensaio de atividade hemolítica como teste de citotoxicidade, assim como realizado por He et al. (2007) que permitiu a verificação do polifenól eugenol encontrado no óleo essencial de cravo produzindo hemólise em eritrócitos. O eugenol mostrou menos citotoxicidade que o antifúngico anfotericina B, pois eugenol em 2000 mg/L causou hemólise em 4,4% dos eritrócitos, enquanto o antifúngico convencional foi de 100% na concentração de 100 mg/L.

Os valores de citotoxicidade encontrados em nosso trabalho para o composto curcumina mostram que na CIM ele não provoca hemólise em hemácias de carneiro, lisando hemácias em concentrações a partir de 512 µg/mL. Khan et al. (2012) verificaram atividade citotóxica da curcumina em concentrações a partir de 650 µg/mL causando hemólise em 11,45% dos eritrócitos, nesse mesmo trabalho verificaram que o fluconazol em 32 µg/mL provocou hemólise em 20% das células. Não há relatos na literatura sobre atividade citotóxica de N-acilhidrazona, porém em nosso estudo esse derivado demonstrou baixa atividade hemolítica. A lise das hemácias por N-acilhidrazona ocorreu a partir de 512 µg/mL correspondendo ao valor de 1,18%, verifica-se que o composto natural curcumina apresentou maior atividade hemolítica (1,79%) quando comparado com a N-acilhidrazona, ambos em concentrações a partir de 512 µg/mL.

Os resultados obtidos neste estudo sugerem que esses compostos representam um potencial terapêutico contra infecções fúngicas, após estudos mais detalhados de farmacologia e toxicidade para validação como fármacos.

7 CONCLUSÕES

Com base nas condições experimentais deste estudo e de acordo com os resultados obtidos, é possível concluir que:

- O método de suscetibilidade *in vitro* permitiu determinar os valores de CIMs para os compostos morina, hesperetina, boldina, curcumina e quatro N-acilhidrazonas (286, 256, 272 e 216 μM).
- Os compostos curcumina e N-acilhidrazona com peso molecular 256 apresentaram melhor atividade antifúngica contra leveduras do gênero *Candida*, apresentando CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$ para a maioria dos isolados, respectivamente.
- Ao realizar a Concentração Fungicida Mínima, para a maioria dos isolados de *Candida* os compostos apresentaram atividade fungistática, pois a inibição do crescimento foi observada em concentrações superiores a 4x CIM.
- A atividade fungistática do polifenól curcumina e do derivado N-acilhidrazona, confirmou-se quando avaliados sobre a interferência na cinética de crescimento de *C. albicans*, onde mostraram redução das leveduras $\leq 99,9\%$.
- A redução de ergosterol verificada na presença dos compostos curcumina e N-acilhidrazona faz pressupor que possivelmente estes compostos atuem na síntese desse importante esteroide presente na membrana celular de *Candida*.
- Reduzida citotoxicidade *in vitro* de curcumina e N-acilhidrazona foram confirmadas pela baixa atividade hemolítica em eritrócitos de carneiro.
- As estratégias atuais para tratamento de candidíase são limitadas devido a fatores como alta toxicidade para o hospedeiro e resistência das leveduras. A otimização desses compostos através de ensaios científicos pode viabilizar o desenvolvimento de agentes farmacologicamente aceitáveis e suficientemente potentes para serem úteis como antifúngicos.

REFERÊNCIAS

- Agra MF, Freitas PF, Barbosa-filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev Bras Farmacogn* 17(1): 114-140, 2007.
- Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Ioanna B. Chinou Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *J. Agric. Food Chem* 49 (9): 4168–4170, 2001.
- Almeida LP, Naghetini CC, Nunan EA, Junqueira RG, Glória MBA. Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminóides e dos óleos essenciais da *Curcuma Longa* L. *Ciênc agrotec* 32(3): 875-881, 2008.
- Altintop MD, Ozdemir A, Turan-Zitouni G, Ilgyn S, Atly O, Ybcan G. Synthesis and biological evaluation of some hydrazone derivatives as new anticandidal and anticancer agents. *Eur J Med Chem* 58: 299–307, 2012.
- Alvarez-Lerma F, Nolla-Salas J, Leon C, Palomar M, Jorda R, Carrasco N, Bobillo F. Candiduria in critically ill patients admitted to intensive care medical units. *Intens Care Med* 29(7): 1069–1076, 2003.
- Anand P, Nair HB, Sung B. Design of curcumin loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity *in vitro* and superior bioavailability *in vivo*. *Biochem Pharmacol* 79(3):330–338, 2010.
- Aneja B, Irfan M, Kapil C, Jairajpuri MA, Maguire R, Kavanagh K, Rizvi MM, Manzoor N, Azam A, Abid M. Effect of novel triazole-amino acid hybrids on growth and virulence of *Candida* species: *in vitro* and *in vivo* studies. *Org Biomol Chem* 14(45):10599-10619, 2016.
- Arendrup MC, *Candida* and candidemia: susceptibility and epidemiology. *Dan Med J* 60(11): 46-98, 2013.
- Arresse JE, Pierard GE. Treatment failures and relapses in onychomycosis: a stubborn clinical problem. *Dermatology* 207(3): 255–260, 2003.
- Arthington-Skaggs BA, Jradi H, Desai T, Morrison CJ. Quantitation of ergosterol content: novel method for determination of fluconazole susceptibility of *Candida albicans*. *J Clin Microbiol* 37(10): 3332-3337, 1999.
- Ataides FS, Chaul MH, El Essal FE, Costa CR, Souza LK, Fernandes OF, Silva MR. Antifungal susceptibility patterns of yeasts and filamentous fungi isolated from nail infection. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 26(12): 1479-1485, 2012.
- Bailly S, Maubon D, Fournier P, Pelloux H, Schwebel C, Chapuis C, Foroni L, Cornet M, Timsit JF. Impact of antifungal prescription on relative distribution and susceptibility of *Candida* spp. e Trends over 10 years. *J Infect* 72(1): 103-111, 2015.
- Baldwin PR, Reeves AZ, Powell KR, Napier RJ, Swimm AI, Sun A, Giesler K, Bommarius B, Shinnick TM, Snyder JP, Liotta DC, Kalman D. Monocarbonyl

analogs of curcumin inhibit growth of antibiotic sensitive and resistant strains of *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Med Chem* 92: 693-699, 2015.

Barbedo LS and Sgarb DBG. Candidíase. *J Bras Doenças Sex Transm* 22(1): 22-38, 2010.

Bassetti M, Righi E, Costa A, Fasce R, Molinari M, Rosso R, Viscoli C. Epidemiological trends in nosocomial candidemia in intensive care. *BMC Infect Dis* 6: 21, 2006.

Bendaha H, Yu L, Touzani R, Souane R, Giaever G, Nislow C, Boone C, El Kadiri S, Brown GW, Bellaoui M. New azole antifungal agents with novel modes of action: Synthesis and biological studies of new tridentate ligands based on pyrazole and triazole. *Eur J Med Chem* 46(9):4117-24, 2011.

Binelli CA, Moretti ML, Assis RS Sauaia N, Menezes PR, Ribeiro E, Geiger DC, Mikami Y, Miyaji M, Oliveira MS, Barone AA, Levin AS. Investigation of the possible association between nosocomial candiduria and candidaemia. *Clin Microbiol Infec* 12(6): 538–543, 2006.

Bisignano C, Filocamo A, Faulks RM, Mandalari G. *In vitro* antimicrobial activity of pistachio (*Pistacia vera* L.) polyphenols. *FEMS Microbiol Lett* 341(1): 62–67, 2013.

Bitar D, Lortholary O, Le Strat Y, Nicolau J, Coignard B, Tattevin P, Che D, Dromer F. Population-based analysis of invasive fungal infections, France, 2001-2010. *Emerg Infect Dis* 20(7): 1149-55, 2014.

Bizerra FC, Nakamura CV, de Poersch C, Estivalet Svidzinski TI, Borsato Quesada RM, Goldenberg S, Krieger MA, Yamada-Ogatta SF. Characteristics of biofilm formation by *Candida tropicalis* and antifungal resistance. *FEMS Yeast Res* 8(3): 442-450, 2008.

Bliss JM, Wong AY, Bhak G, Laforce-Nesbitt SS, Taylor S, Tan S, Stoll BJ, Higgins RD, Shankaran S, Benjamin DK Jr. *Candida* virulence properties and adverse clinical outcomes in neonatal candidiasis. *J Pediatr* 161(3): 441-447, 2012.

Bluma R, Amaiden MR, Daghero J, Etcheverry M. Control of *Aspergillus* section Flavi growth and aflatoxin accumulation by plant essential oils. *J Appl Microbiol* 105(1): 203-14, 2008.

Borges-Argáez R, Canche-Chay CI, Peña-Rodríguez LM, Fernández SS, Salinas GMM. Antimicrobial activity of *Diospyros anisandra*. *Fitoterapia* 78(5): 370–372, 2007.

Bostrom J, Hogner A, Llin A, Wellner E, Plowright AT. Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. *J Med Chem* 55(5): 1817-30, 2012.

Braga FG, Bouzada ML, Fabri RL, de Matos M, Moreira FO, Scio E, Coimbra ES. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. *J Ethnopharmacol* 111(2): 396-402, 2007.

Carrillo-Munoz AJ, Giusiano G, Ezkurra PA, Quindos G. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. *Rev Espa Quimioter* 19(2): 130-139, 2006.

Castro TL, Coutinho HDM, Gedeon CC, Santos JM, Santana WJ, Souza LBS. Mecanismos de Resistência da *Candida* Sp wwa Antifúngicos. *Infarma* 18: 9-10, 2006.

Chakrabarti A, Chatterjee SS, Rao KLN, Zameer MM, Shivaprakash MR, Singhi S, Singh R, Varma SC. Recent experience with fungaemia: change in species distribution and azole resistance. *Scand J Infect Dis* 41(4): 275–284, 2009.

Chen J, He ZM, Wang FL, Zhang ZS, Liu XZ, Zhai DD, Chen WD. Curcumin and its promise as an anticancer drug: An analysis of its anticancer and antifungal effects in cancer and associated complications from invasive fungal infections. *Eur J Pharmacol* 772:33-42, 2016.

Chen S, Tong Z, Lee O, Halliday C, Playford E, Widmer F, Kong F, Wu C & Sorrell. Clinician response to *Candida* organisms in the urine of patients attending hospital. *Eur J Clin Microbiol* 27(3): 201–208, 2008.

Cicero AFG and Colletti A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome. *Phytomedicine* 23(11): 1134-44, 2016.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute M27-S4: Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Fourth Informational Supplement. Pennsylvania, 32(17): 28, 2012.

CLSI-Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, Approved Standard. Document M27–S3, Pennsylvania, 28: 19087-1898, 2008.

Colombo AL, Guimarães T, Camargo LF, Richtmann R, Queiroz-Telles Fd, Salles MJ, Cunha CA, Yasuda MA, Moretti ML, Nucci M. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. *Braz J Infect Dis* 17(3): 283-312, 2013.

Colombo AL, Guimarães T, Silva LRBF, Monfardini LPDA, Cunha AKB, Rady P, Alves T, Rosas RC. Prospective Observational Study of Candidemia in Sao Paulo, Brazil: Incidence Rate, Epidemiology, and Predictors of Mortality. *Infect Cont Hosp* 28(5): 570–576, 2007.

Corti M, Solari R, De Carolis L, Cangelosi D, Arechavala A, Negroni R. *Candida parapsilosis* meningitis in a patient with AIDS. Report of a case and review of the literature. *Rev Iberoam Micol* 30(2): 122-124, 2013.

Costa CR, Passos XS, Souza LKH, Lucena PA, Fernandes OFL, Silva MRR. Differences in exoenzyme production and adherence ability of *Candida* spp. isolates from catheter, blood and oral cavity. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 52(3): 139-43, 2010.

Costa MP, Bozinis MCV, Andrade WM, Costa CR, Silva AL, Oliveira CMA, Kato

L, Fernandes OFL, Souza LKH, Silva MRR. Antifungal and cytotoxicity activities of the fresh xylem sap of *Hymenaea courbaril* L. and its major constituent fisetin. *BMC Complement Alternative Med* 14(1): 245, 2014.

Coutinho MAS, Muzitano MF, Costa SS. Flavonóides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. *Rev Virt Quím* 3(1): 241-256, 2009.

Criseo G, Scordino F, Romeo O. Current methods for identifying clinically important cryptic *Candida* species. *J Microbiol Methods* 111: 50–56, 2015.

Cruz MC, Santos PO, Barbosa AM Jr, de Mélo DL, Alviano CS, Antonioli AR, Alviano DS, Trindade RC. Antifungal activity of Brazilian medicinal plants involved in popular treatment of mycoses. *J Ethnopharmacol* 111(2): 409-412, 2007.

De Logu A, Saddi M, Cardia MC, Borgna R, Sanna C, Saddi B, Maccioni E. In vitro activity of 2-cycohexylidenhydrazo-4-phenyl-thiazole compared with those of amphotericin B and fluconazole against clinical isolates of *Candida* spp. and fluconazole resistant *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* 55: 692-698, 2005.

De Luca C, Guglielminetti M, Ferrario A, Calabrò M, Casari E. Candidemia: species involved, virulence factors and antimycotic susceptibility. *New Microbiol* 35(4): 459-68, 2012.

De Martino L, Mencherini T, Mancini E, Aquino RP, De Almeida LF, De Feo V. In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids. *Int J Mol Sci* 13(5): 5406-19, 2012.

Ding F and Peng W. Biological activity of natural flavonoids as impacted by protein flexibility: an example of flavanones. *Mol Biosyst* 11: 1119-1133, 2015.

Dodds Ashley ES, Lewis R, Lewis JS, Martin C, Andes D. Pharmacology of systemic antifungal agents. *Clin Infect Dis* 43(1): S28–39, 2006.

Dorko E, Pilipcinec E, Tkacikova L. Candidal urinary tract infections caused by non-albicans *Candida* species. *Folia Microbiol* 47(2): 182–184, 2002.

Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues-das-Dores RG, Santos AF, Nagem TJ. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl* 28(3): 241- 249, 2007.

Dovigo LN, Carmello JC, de Souza Costa CA, Vergani CE, Brunetti IL, Bagnato VS, Pavarina AC. Curcumin-mediated photodynamic inactivation of *Candida albicans* in a murine model of oral candidiasis. *Med Mycol* 51(3): 243-251, 2013.

Dovigo LN, Pavarina AC, Carmello JC, Machado AL, Brunetti IL, Bagnato VS. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. *Lasers Surg Med* 43(9): 927-934, 2011a.

Dovigo LN, Pavarina AC, Ribeiro APD, Brunetti IL, Costa CAS, Jacomassi DP, Bagnato VS, Kurachi C. Investigation of the photodynamic effects of curcumin against *Candida albicans*. *Photochem Photobiol* 87(4):895-903, 2011b.

Dudhatra GB, Mody SK, Awale MM, Patel HB, Modi CM, Kumar A, Kamani DR, Chauhan BN. A Comprehensive Review on Pharmacotherapeutics of Herbal Bioenhancers. *Scientific World J* 2012: 637-953, 2012.

Durdu M, Güran M, Kandemir H, Ilkit M, Seyedmousavi S. Clinical and Laboratory Features of Six Cases of Candida and Dermatophyte Folliculitis and a Review of Published Studies. *Mycopathologia* 181(1-2): 97-105, 2016.

Dzialo M, Mierziak J, Korzun U, Preisner M, Szopa J, Kulma A. The Potential of Plant Phenolics in Prevention and Therapy of Skin Disorders. *Int J Mol Sci* 17(2): 160, 2016.

Endo EH, Cortez DA, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol* 161(7): 534-40, 2010.

Favalessa OC, Ribeiro LC, Tadano T, Fontes CJ, Dias FB, Coelho BP, Hahn RC. First description of phenotypic profile and *in vitro* drug susceptibility of *Cryptococcus spp* yeast isolated from HIV-positive and HIV-negative patients in State of Mato Grosso. *Rev Soc Bras Med Trop* 42(6): 661-665, 2009.

Ferrazzano GF, Amato I, Ingenito A, Zarrelli A, Pinto G, Pollio A. Plant Polyphenols and Their Anti-Cariogenic Properties: A Review. *Molecules* 16(2): 1486-1507, 2011.

Ferreira FD, Mossini SAG, Ferreira FMD, Arrotéia CC, Costa CL, Nakamura CV, MM. The Inhibitory Effects of Curcuma longa L. Essential Oil and Curcumin on *Aspergillus flavus* Link Growth and Morphology. *Sci World J* 2013(5): 343804, 2013.

Finkel JS, Mitchell AP. Genetic control of *Candida albicans* biofilm development. *Nat Rev Microbiol* 9(2): 109-118, 2011.

Fraisse T, Crouzet J, Lachaud L, Durand A, Charachon S, Lavigne JP, Sotto A. Candiduria in those over 85 years old: a retrospective study of 73 patients. *Intern Med* 50(18): 1935-1940, 2011.

Ghosh S, Banerjee S, Sil PC. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: A recent update. *Food Chem Toxicol* 83: 111-124, 2015.

Gonzalez Gravina H, Moran EG, Zambrano O, Chourio ML, Valero SR, Robertis S, Mesa L. Oral candidiasis in children and adolescents with cancer. Identification of *Candida spp*. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 12(6): 419-423, 2007.

Gulati M and Nobile CJ, *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. *Microbes Infect* 18(5): 310-21, 2016.

Gullece AA, Aslan M, Sokmen F, Sahin A, Adiguzel G, Agar G, Sokmen A. Screening the antioxidant and antimicrobial properties of the lichens *Parmelia saxatilis*, *Platismatia glauca*, *Ramalina pollinaria*, *Ramalina polymorpha* and *Umbilicaria nylanderian*. *Phytomedicine* 13: 515-521, 2006.

Gupta SC, Patchva S, Aggarwal BB. Therapeutic Roles of Curcumin: Lessons Learned from Clinical Trials. *AAPS J* 15(1): 195-218, 2013.

Gupta SC, Patchva S, Koh W, Aggarwal BB. Discovery of Curcumin, a Component of the Golden Spice, and Its Miraculous Biological Activities. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 39(3): 283-299, 2012.

He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. *Mycopathologia* 163:137-143, 2007.

Herkert PF, Gomes RR, Muro MD, Pinheiro RL, Fornari G, Vicente VA, Queiroz-Telles F. In vitro susceptibility and molecular characterization of *Candida* spp. from candidemic patients. *Rev Iberoam Micol* 32(4): 221-228, 2015.

Hofs S, Mogavero S, Hube B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol* 54(3): 149-169, 2016.

Ishida K, Yamaguchi MU, Yamada-Ogatta SF, Naklamura TU, Svidzinski TIE, Nakamura CV. Characterization of *Candida* spp. isolated from vaginal fluid: identification, antifungal susceptibility, and virulence profile. *Health Sci* 35(1): 1-8, 2013.

Jiang C, Dong D, Yu B, Cai G, Wang X, Ji Y, Peng Y. Mechanisms of azole resistance in 52 clinical isolates of *Candida tropicalis* in China. *J Antimicrob Chemother* 68(4): 778-785, 2013.

Kajal A, Bala S, Sharma N, Kamboj S, Saini V. Therapeutic Potential of Hydrazones as Anti-Inflammatory Agents. *Int J Med Chem* 2014: 1-11, 2014.

Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem* 20(19): 5678-5698, 2012.

Kauffman CA, Vazquez JA, Sobel JD, Gallis HA, McKinsey DS, Karchmer AW, Sugar AM, Sharkey PK, Wise GJ, Mangi R, Mosher A, Lee JY, Dismukes WE. Prospective multicenter surveillance study of funguria in hospitalized patients. *Clin Infect Dis* 30(1): 14-18, 2000.

Khan A, Ahmad A, Akhtar F, Yousuf S, Xess I, Khan LA, Manzoor N. Ocimum sanctum essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res Microbiol* 161(10): 816-23, 2010.

Khan MSA, Ahmad I, Aqil F, Owais M, Shahid M, Musarrat J. Virulence and Pathogenicity of Fungal Pathogens with Special Reference to *Candida albicans*. *Comb Fungal Infect* 21-45, 2010.

Khan N, Shreaz S, Bhatia R, Ahmad SI, Muralidhar S, Manzoor N, Khan LA. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. *Fitoterapia* 83(3): 434-440, 2012.

Kim CA and Arnason JT. Mini Review of Phytochemicals and Plant Taxa with

Activity as Microbial Biofilm and Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules* 21(1): E29, 2015.

Klepser ME, Ernst EJ, Ernst ME, Pfaller MA. Growth Medium Effect on the Antifungal Activity of LY 303366. *Diagn Microbiol Infect Dis* 29:227-231, 1997.

Klepser ME, Ernst EJ, Lewis RE, Ernst ME, Pfaller MA. Influence of Test Conditions on Antifungal Time-Kill Curve Results: Proposal for Standardized Methods. *Antimicrob Agents Chemother* 42(5): 1207-1212, 1998.

Kobayashi C, Fernandes ODFL, Miranda K, Sousa E & Silva MRR. Candiduria in hospital patients: a study prospective. *Mycopathologia* 158(1): 49–52, 2004.

Kołaczkowska A and Kołaczkowski M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-albicans Candida species. *J Antimicrob Chemother* 71(6): 1438-50, 2016.

Kuçukguzel SG, Rollas S, Erdeniz H, Kiraz M. Synthesis, Characterization and Antimicrobial Evaluation of Ethyl 2-Arylhdyrazono-3-oxobutyrate. *Eur J Med Chem* 34: 153-160, 1999.

Kumar A, Dhamgaye S, Maurya IK, Singh A, Sharma M, Prasad R. Curcumin targets cell wall integrity via calcineurin-mediated signaling in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents and Chemother* 58(1): 167-75, 2014.

Kumar A, Yadav A, Gupta N, Kumar S, Gupta N, Kumar S, Yadav V, Prakash A, Gurjar H. Metabolites In Plants And Its Classification. *World J Pharm Pharmac Sci* 4(1): 287-305, 2015.

Kumar VG, Latha R, Vedhagiri K, Sathiamoorthi T, Jayarani G, Sasikala R, Selvin J & Natarajaseenivasan K. Phospholipase C, proteinase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from pulmonary tuberculosis patients. *J Mycol Med* 19: 3–10, 2009.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T. *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier, United States of America, 2011.

Lass-Flörl C, Perkhöfer S, Mayr A. In vitro susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. *Mycoses* 53(1): 1-11, 2010.

Lass-Flörl C. The changing face of epidemiology of invasive fungal disease in Europe. *Mycoses* 52(3): 197–205, 2009.

Lee JH, Lee BK, Kim JH, Lee SH, Hong SK. Comparison of chemical compositions and antimicrobial activities of essential oils from three conifer trees; *Pinus densiflora*, *Cryptomeria japonica*, and *Chamaecyparis obtusa*. *J Microbiol Biotechnol* 19(4): 391-62, 2009.

Leite AM, Lima EO, Souza EL, Diniz MFFM, Trajano VN, Medeiros IA. Inhibitory effect of β -pinene, α -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Braz J Pharmaceutic Sci* 43(1), 2007.

- Lemos JA, Costa CR, Araújo CR, Souza LKH, Silva MRR. susceptibility testing of *Candida albicans* isolated from oropharyngeal mucosa of HIV⁺ patients to fluconazole, amphotericin B and Caspofungin. killing kinetics of caspofungin and amphotericin B against fluconazole resistant and susceptible isolates. *Braz J Microbiol* 40(1): 163–169, 2009.
- Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(1): 21-31, 2012.
- Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, de Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Rev Bras Farmacogn* 16(2): 197-201, 2006.
- Luque AG, Biasoli MS, Tosello ME, Binolfi A, Lupo S, Magaro HM. Oral yeast carriage in HIV-infected and non- infected populations in Rosario, Argentina. *Mycoses* 52(1): 53-59, 2009.
- Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. In vitro activity of fluconazole and voriconazole against clinical isolates of *Candida* spp. by E-test method. *Trop Biomed* 27(2): 200-207, 2010.
- Maillard LT, Bertout S, Quinonéro O, Akalin G, Turan-Zitouni G, Fulcrand P. Synthesis and anti-*Candida* activity of novel 2-hydrazino-1,3-thiazole derivatives. *Bioorg Med Chem Lett* 23: 1803-1807, 2013.
- Majewska BJ, Salewska N, Borowski E, Milewski S, Malic S, Wei XQ, Hayes AJ, Wilson MJ, Williams DW. Novel Nystatin A₁ derivatives exhibiting low host cell toxicity and antifungal activity in an in vitro model of oral candidosis. *Med Microbiol Immunol* 203(5):341-55, 2014.
- Mandalari G, Bisignano C, D'Arrigo M, Ginestra G, Arena A, Tomaino A, Wickham MS. Antimicrobial potential of polyphenols extracted from almond skins. *Letts Appl Microbiol* 51(1):83-9, 2010.
- Maregesi SM, Pieters L, Ngassapa OD, Apers S, Vingerhoets R, Cos P, Berghe DA, Vlietinck AJ. Screening of some Tanzanian medicinal plants from Bunda district for antibacterial, antifungal and antiviral activities. *J Ethnopharmacol* 119(1): 58-66, 2008.
- Martínez JM, Gómez EV, Pemán J, Cantón E, García MG, del Castillo Agudo L. Identification of pathogenic yeast species by polymerase chain reaction amplification of the RPS0 gene intron fragment . *J Appl Microbiol* 108(6):1917-27, 2010.
- Martinez LR and Fries BC. Fungal Biofilms: Relevance in the Setting of Human Disease. *Curr Fungal Infect Rep* 4(4): 266-275, 2010.
- Martins CV, da Silva DL, Neres AT, Magalhães TF, Watanabe GA, Modolo LV, Sabino AA, de Fátima A, de Resende MA. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *J Antimicrob Chemother* 63(2):337-339, 2009.
- Martins M, Henriques M, Ribeiro AP, Fernandes R, Goncalves V, Seabra A, Azeredo J, Oliveira R. Oral *Candida* carriage of patients attending a dental clinic

in Braga, Portugal. *Rev Iberoam Micol* 27(3): 119–124, 2010a.

Martins M, Uppuluri P, Themis DD, Cleary IA, Henriques M, Lopez-Ribot LJ & Oliveira R. Presence of extracellular DNA in the *Candida albicans* matrix and its contribution to biofilms. *Mycopathologia* 169(5): 323–331, 2010b.

Mayer FL, Wilson D, Hube B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4(2): 119-128, 2013.

Mazari W, Boucherit-Otmani Z, Boucherit K. In vitro susceptibility of amphotericin-B, voriconazole and caspofungin against *Candida guilliermondii* biofilms, isolated from dentals units water pipes, under different growth phases. *J Mycol Med* 25: 57-62, 2015.

McCarty TP and Pappas PG. Invasive Candidiasis. *Infect Dis Clin N Am* 30: 103–124, 2016.

Mesa-Arango AC, Ramos JM, Zapata B, Durán C, Galvis LB, Stashenko E. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104(6): 878-884, 2009.

Metin DY, Hilmioglu-Polat S, Samlioglu P, Doganay-Ofiazoglu B, Inci R, Tumbay E. Evaluation of antifungal susceptibility testing with microdilution and Etest methods of *Candida* blood isolates. *Mycopathologia* 172(3): 187-199, 2011.

Miranda LN, van der Heijden IM, Costa SF, Sousa AP, Sienna RA, Gobara S, Santos CR, Lobo RD, Pessoa VP, Levin AS. *Candida* colonisation as a source for candidaemia. *J Hosp Infect* 72(1): 9-16, 2009.

Moghadamtousi SZ, Kadir HA, Hassandarvish P, Tajik H, Abubakar S, Zandi K. A Review on Antibacterial, Antiviral, and Antifungal Activity of Curcumin. *BioMed Research International* 2014: 1-12, 2014.

Moran MP, Fernandez JM, Tortosa CR, Tortosa MCR. Curcumin and Health. *Molecules* 21: 1-22, 2016.

Naglik JR, Challacombe SJ, Hube B. *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis. *Microbiol Mol Biol Rev* 67(3): 400-428, 2003.

Neelofar K, Shreaz S, Rimple B, Muralidhar S, Nikhat M, Khan LA. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Can J Microbiol* 57: 204–210, 2011.

Negi N, PraKash P, Gupta ML, Mohapatra TM. Possible Role of Curcumin as an Efflux Pump Inhibitor in Multi Drug Resistant Clinical Isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Clin Diagn Res* 8(10): 04-07, 2014.

Negi VJ, Sharma AK, Negi JS, Ram V Biological Activities Of Hydrazone Derivatives In The New Millennium. *Int J Pharmaceut Chem* 4(2): 100-109, 2012.

Negri M, Silva S, Henriques M, Oliveira R. Insights into *Candida tropicalis* nosocomial infections and virulence factors. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(7):1399-412, 2012.

- Nett JE, Andes DR. Antifungal Agents Spectrum of Activity, Pharmacology, and Clinical Indications. *Infect Dis Clin North Am* 30(1): 51-83, 2016.
- Nucci M, Colombo AL. Candidemia due to *Candida tropicalis*: clinical, epidemiologic, and microbiologic characteristics of 188 episodes occurring in tertiary care hospitals. *Diagn Microbiol Infect Dis* 58(1): 77-82, 2007.
- Nucci M, Queiroz-Telles F, Tobón AM, Restrepo A, Colombo AL. Epidemiology of opportunistic fungal infections in Latin America. *Clin Infect Dis* 51(5): 561-570, 2010.
- O'Brien P, Carrasco-Pozo C, Speisky H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chem Biol Interact* 159(1): 1–17, 2006.
- Odds FC; Brown AJ, Gow NA. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends in Microbiol* 11(6): 272–279, 2003.
- Orhan DD, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res* 165(6): 496-504, 2010.
- Pakshir K, Zomorodian K, Karamitalab M, Jafari M, Taraz H, Ebrahimi H. Phospholipase, esterase and hemolytic activities of *Candida* spp. isolated from onychomycosis and oral lichen planus lesions. *J Mycol Med* 23(2): 113-118, 2013.
- Pappas PG, Kauffman CA, Andes D, Benjamin DK, Calandra TF, Edwards JE, Filler SG, Fisher JF, Kullberg BJ, Ostrosky-Zeichner L, Reboli AC, Rex JH, Walsh TJ, Sobel JD. Infectious Diseases Society of A. Clinical practice guidelines for the management of candidiasis: 2009 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 48(5): 503-535, 2009.
- Passone MA and Etcheverry M. Antifungal impact of volatile fractions of *Peumus boldus* and *Lippia turbinata* on *Aspergillus* section *Flavi* and residual levels of these oils in irradiated peanut. *Int J Food Microbiol* 168-169: 17-23, 2014.
- Passos XS, Costa CR, Araújo CR, Nascimento ES, Souza LKH, Fernandes OFL, Sales WS, Silva MRR. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* spp. bloodstream isolates from a Brazilian tertiary care hospital. *Mycopathologia* 163: 145-151, 2007.
- Passos XS, Sales WS, Maciel PJ, Costa CR, Miranda KC, Lemos JA, Batista MA, Silva MRR. *Candida* colonization in intensive care unit patients' urine. *Mem I Oswaldo Cruz* 100(8): 925–928, 2005.
- Perea S, Patterson TF. Antifungal resistance in pathogenic fungi. *Clin Infect Dis* 35(9): 1073-1080, 2002.
- Perlroth J, Choi B, Spellberg B. Nosocomial fungal infections: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Med Mycol* 45(4): 321-46, 2007.
- Petrovska BB. Historical Review of Medicinal Plants' usage. *Pharmacogn Rev* 6(11): 1-5, 2012.

Pfaller MA and Diekema DJ. Epidemiology of invasive mycoses in north America. *Crit Rev Microbiol* 36(1): 1-53, 2010.

Pfaller MA, Castanheira M, Messer AS, Moet GJ, Jones RN. Variation in *Candida* spp. distribution and antifungal resistance rates among bloodstream infection isolates by patient age: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2008–2009). *Diagn Micr Infec Dis* 68(3): 278–283, 2010.

Pfaller MA, Diekema DJ, Sheehan DJ. Interpretative breakpoints for fluconazole and *Candida* revisited: a blueprint for the future of antifungal susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev* 19(2): 435-47, 2006.

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

Pfaller MA, Sheehan DJ, Rex JH. Determination of fungicidal activities against yeasts and molds: lessons learned from bactericidal testing and the need for standardization. *Clin Microbiol Rev* 17(2): 268-280, 2004.

Pinto E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* (*Eugenia caryophyllus*) on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. *J Clin Microbiol* 58(Pt 11): 1454-1462, 2009.

Pongsiriwet S, Iamaroon A, Sriburee P, Pattanaporn K, Krisanaprakornkit S. Oral colonization of *Candida* species in perinatally HIV-infected children in northern Thailand. *J Oral Sci* 46(2):101-105, 2004.

Quindos G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. *Rev Iberoam Micol* 31(1): 42-48, 2014.

Reis MP, Carvalho CR, Andrade FA, Fernandes OF, Arruda W, Silva MR. Fisetin as a promising antifungal agent against *Cryptococcus neoformans* species complex. *Journal of Applied Microbiology* 121(2): 373-379, 2016.

Rollas S and Kuçukguzel SG. Biological Activities of Hydrazone Derivatives. *Molecules* 12(8): 1910-1939, 2007.

Ruhnke M. Epidemiology of *Candida albicans* yeasts. *Curr Drug Targets* 7(4): 495-504, 2006.

Ruiz ALTG, Taffarello D, Souza VHS, Carvalho JE. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Rev Bras Farmacogn* 18(2): 295-300, 2008.

Saeed A, Ifzan Arshad M, Bolte M, Fantoni AC, Delgado Espinoza ZY, Erben MF. On the roles of close shell interactions in the structure of acyl-substituted hydrazones: An experimental and theoretical approach. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 157(15): 138–145, 2016.

Sanglard D, Coste A, Ferrari S. Antifungal drug resistance mechanisms in fungal pathogens from the perspective of transcriptional gene regulation. *FEMS Yeast Research* 9(7): 1029-50, 2009.

Santana DP, Ribeiro EL, Menezes ACS, Naves PLF. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. *Rev Cienc Med Biol* 12(2): 229-233, 2013.

Sardi JC, Scorzoni L, Bernardi T, Fusco-Almeida AM, Mendes Giannini MJ. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *J Med Microbiol* 62(1): 10-24, 2013.

Sariguzel FM, Berk E, Koc AN, Sav H, Demir G. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures. *J Infect Dev Ctries* 9(8):857-864, 2015.

Scorzoni L, Benaducci T, Fusco-almeida AM, Silva DHS, Bolzani VS, Mendes-Giannini MJS. The use of standart methodology for determination of antifungal activity of natural products against medical yeasts *Candida* sp and *Cryptococcus* sp. *Braz J Microbiol* 38: 391-397, 2007.

Secchi D, Bizzarri B, Bolasco A, Carradori S, D'Ascenzio M, Rivanera D, Mari E, Polletta L, Zicari A. Synthesis, anti-*Candida* activity, and cytotoxicity of new (4-(4-iodophenyl) thiazol-2-yl) hydrazine derivatives. *Eur J Med Chem* 53: 246–53, 2012.

Seneviratne CJ, Rajan S, Wong SS, Tsang DN, Lai CK, Samaranayake LP, Jin L. Antifungal Susceptibility in Serum and Virulence Determinants of *Candida* Bloodstream Isolates from Hong Kong. *Front Microbiol* 7: 216, 2016.

Serrão SA, Weber CJ, Costa F, Souza MM. Avaliação dos efeitos do flavonóide morina sobre a memória de animais normais e com Alzheimer induzido por D-galactose. *Rev Bras Farma* 92(4): 384-391, 2011.

Sharma M, Dhamgaye S, Singh A, Prasad R. Lipodome analysis reveals antifungal polyphenol curcumin affects membrane lipid homeostasis. *Front Biosci* 4: 1195–1209, 2012.

Sharma M, Manoharlal R, Negi AS, Prasad R. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin I in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. *FEMS Yeast Res* 10(5): 570-578, 2010.

Silva MR, Oliveira JG Jr, Fernandes OF, Passos XS, Costa CR, Souza LK, Lemos JA, Paula JR. Antifungal activity of *Ocimum gratissimum* towards dermatophytes. *Mycoses* 48(3): 172-175, 2005.

Silva S, Henriques M, Martins A, Oliveira R, Williams D, Azeredo J. Biofilms of non-*Candida albicans* *Candida* species: quantification, structure and matrix composition. *Med Mycol* 47(7): 681-689, 2009.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. Adherence and biofilm formation of non-*Candida albicans* *Candida* species. *Trends Microbiol* 19(5): 241-247, 2011.

Silva S, Negri M, Henriques M, Oliveira R, Williams DW, Azeredo J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology,

pathogenicity and antifungal resistance. *FEMS Microbiol Rev* 36(2): 288-305, 2012.

Soll DR. *Candida* commensalism and virulence: the evolution of phenotypic plasticity. *Acta Tropica* 81(2): 101-110, 2002.

Spolidorio DMP, Boriollo MFG, Estrela C, Spolidorio LC. Diferentes Métodos Fenotípicos para Isolamento e Identificação de Espécies de *Candida*. *Robrac* 18(45): 18-26, 2009.

Sun K, Xiang L, Ishihara S, Matsuura A, Sakagami Y, Qi J. Anti-aging effects of hesperidin on *Saccharomyces cerevisiae* via inhibition of reactive oxygen species and UTH1 gene expression. *Biosci Biotechnol Biochem* 76(4): 640-5, 2012.

Ta CA and Arnason JT. Mini Review of Phytochemicals and Plant Taxa with Activity as Microbial Biofilm and Quorum Sensing Inhibitors. *Molecules* 21(1): 29, 2015.

Tavares LC, Chiste JJ, Santos MGB, Penna TCV. Synthesis and biological activity of nifuroxazide and analogs. II. *Boll Chim Farm* 138: 432-436, 1999.

Teodoro GR, Ellepola K, Seneviratneand CJ Cristiane, Koga-Ito CY. Potential Use of Phenolic Acids as Anti-*Candida* Agents: A Review. *Front Microbiol* 6: 1420, 2015.

Thompson DS, Carlisle PL, Kadosh D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell* 10(9): 1173-1182, 2011.

Tortorano AM, Kibbler C, Peman J, Bernhardt H, Klingspor L, Grillot R. *Candidaemia* in Europe: epidemiology and resistance. *Int J Antimicrob Agents* 27(5): 359–366, 2006.

Trick WE, Fridkin SK, Edwards JR, Hajjeh RA, Gaynes RP. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. *Clin Infect Dis* 35(5): 627–630, 2002.

Trofa D, Gácsér A, Nosanchuk JD. *Candida parapsilosis*, an emerging fungal pathogen. *Clin Microbiol Rev* 21:606-25, 2008.

Tupe SG and Deshpande MV. Current status and new directions in antifungal drug development. *Biotechnology: Beyond Borders* 241-252, 2013.

Ulusoy N, Çapan G, Otuk G, Kiraz M. Synthesis and antimicrobial activity of new 6- phenylimidazo[2,1-b]thiazole derivatives. *Boll Chim Farm* 139: 167-172, 2000.

Upendra RS, Khandelwal P, Reddy AHM. Turmeric powder (*Curcuma longa* Linn.) as an antifungal agent in plant tissue culture studies. *Int J Engin Sci* 12(3): 7899-7904, 2011.

Van der Meer JW, van de Veerdonk FL, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Severe *Candida* spp. infections: new insights into natural immunity. *Int J Antimicrob Agents* 36(2): 58-62, 2010.

Verma G, Marella A, Shaquiquzzaman M, Akhtar M, Ali MR, Alam MM. A review exploring biological activities of hydrazones. *J Pharm Bioallied Sci* 6(2): 69-80, 2014.

Vila R, Freixa B, Cañigüeral S. Antifungal compounds from plants. *Rec Advanc Pharmaceut Sci III* 2013: 23-43, 2013.

Wang H, Kong F, Sorrell TC, Wang B, McNicholas P, Pantarat N, Ellis D, Xiao M, Widmer F, Chen SC. Rapid detection of *ERG11* gene mutations in clinical *Candida albicans* isolates with reduced susceptibility to fluconazole by rolling circle amplification and DNA sequencing. *BMC Microbiol* 9: 167, 2009.

Zuzarte M, Vale-Silva L, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Vaz S, Canhoto J, Pinto E, Salgueiro L. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 31(7): 1359-1366, 2012.