

AVALIAÇÃO DO DANO CITOTÓXICO E GENOTÓXICO DE EXTRATOS DE *Curcuma longa* (Zingiberaceae) FRENTE À *Candida parapsilosis*

*CYTOTOXIC AND GENOTOXIC DAMAGE ASSESSMENT OF *Curcuma longa* (Zingiberaceae) EXTRACTS ON *Candida parapsilosis**

Jéssica Cristina da Silva Nascimento

Faculdade de Farmácia, FACER Faculdades - Unidade de Ceres, Ceres-GO, Brasil.
melnascimento_farmacia@hotmail.com

Amanda Gregorim Fernandes

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia - GO, Brasil.
mandika_greg@yahoo.com.br

Gilmar Aires da Silva

Faculdade de Farmácia, FACER Faculdades - Unidade de Ceres, Ceres-GO, Brasil.
gilmaraire@hotmail.com

Lívia do Carmo Silva

Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás - UFG, Goiânia - GO, Brasil.
livia.lbm.ufg@gmail.com

Renata Silva do Prado

Faculdade de Farmácia, FACER Faculdades - Unidade de Ceres, Ceres-GO, Brasil.
renata.ufg@hotmail.com

Endereço para correspondência:

Av. Brasil, S/N, Qd. 13; Morada Verde; Ceres – GO
CEP – 76300-000
Fone/Fax: (62) 3323-1040
e-mail: renata.ufg@hotmail.com

RESUMO: Nas duas últimas décadas, os relatos de infecções fúngicas causadas por *Candida parapsilosis* aumentaram consideravelmente, bem como o aparecimento de isolados resistentes, fazendo com que a busca por novas terapias adquiram relevância, destacando-se estudos com produtos naturais. *Curcuma longa* tem sido estudada por suas capacidades antimicrobiana e antifúngica. O presente trabalho teve como objetivo avaliar o tipo de dano causado por *C. longa* sobre *C. parapsilosis* através de ensaios citotóxicos e genotóxicos. Neste estudo foi empregado a investigação microscópica do dano morfológico, teste de microdiluição em placas com emprego do sorbitol, ergosterol e resazurina, bem como, método de redução do tetrazólio (MTT), além da extração do DNA genômico do fungo. Foi realizado ensaio em meio nutriente líquido para avaliação dos danos morfológicos e pôde-se observar

agregação celular, acompanhado de lise e grande quantidade de *debris* celular. Quando submetido ao ensaio com sorbitol e ergosterol, observou-se que houve dano tanto na parede celular do fungo quanto na membrana plasmática, sendo mais acentuado na parede. Ao aplicar o ensaio com resazurina, houve diminuição da atividade mitocondrial do fungo obtendo-se uma CIM no valor de 62,5 ppm para o tratado com rizomas e CIM de 500 ppm para o tratado com folhas, este resultado foi confirmado pelo MTT, onde a porcentagem da atividade mitocondrial foi igual a 100% para folhas e 44,5% para rizomas. Finalmente, na avaliação genômica, não houve danos causados por ambos os extratos de *C. longa* sobre o DNA genômico do fungo.

Palavras-chave: Candidíase. Citotoxicidade. Genotoxicidade. Novas terapias.

ABSTRACT: In the last two decades, increased by the reports of fungal infections caused by *Candida parapsilosis*, as well as the appearance of resistant isolates causing the search for new therapies acquires relevance, high lighting studies with natural products. *Curcuma longa* has been studied by its antimicrobial and capacities of antifungal agents. The present work had as objective to evaluate the type of damage caused by *C. longa* on *C. parapsilosis* through trials cytotoxic and genotoxic. Where was employed the microscopic investigation of morphological damage, test of broth microdilution plates with employment of sorbitol, ergosterol and resazurin as well as, a method of reduction of the tetrazolium chloride (MTT), in addition to the extraction of genomic DNA of the fungus. Test was conducted in nutrient medium liquid for assessment of the damage and morphologic could observe cellular aggregation, accompanied by lysis and large quantity of cellular *debrity*, already when subjected to the test with sorbitol and ergosterol, was observed that there was damage both in the cell wall of the fungus as in the plasmatic membrane, being more pronounced on the wall. When applied the test with resazurin there was decreased mitochondrial activity of the fungus obtaining a CIM in value of 62.5 ppm for the treaty with rhizomes and MIC of 500 ppm for the treaty with leaves, this result was confirmed by MTT, where the percentage of mitochondrial activity was equal to 100% for leaves and 44.5% for rhizomes, finally, in the assessment genomics, there was no damage caused by both extracts of *C. longa* on the genomic DNA of the fungus.

Keywords: Candidiasis. Cytotoxicity. Genotoxicity. New therapies.

1 INTRODUÇÃO

2 Nas últimas duas décadas, houve um aumento considerável nos relatos de infecções
3 fúngicas oriundas de *Candida albicans* e outras espécies do gênero *Candida*, designado estas
4 como não-*albicans* (GOMES et al., 2010). Segundo Colombo e colaboradores (2006), dentre
5 as espécies não-*albicans*, as que mais causam infecções fúngicas são *Candida tropicalis*,
6 *Candida parapsilosis* seguida de *Candida glabrata*.

7 A *C. albicans* é a espécie mais prevalente em infecções fúngicas, tanto no indivíduo
8 sadio quanto no doente (cerca de 80% das candidíases em humanos), seguida da *C.*
9 *parapsilosis* (CALDERONE, 2002; COSTA DE OLIVEIRA et al., 2008). A *C. parapsilosis*
10 assim como a *C. albicans* tem a capacidade de formar biofilmes em superfícies inertes e
11 biológicas como os cateteres, dispositivos móveis e fluídos, sendo então, transmitida
12 frequentemente sob a forma horizontal através de fontes externas, mesmo sem a colonização
13 prévia do fungo (TROFA; GÁCSEK; NOSANCHUK, 2008).

14 As infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida*, denominadas candidíases,
15 podem ser desde superficiais a sistêmicas, sendo que, atingem principalmente pacientes
16 imunocomprometidos como os portadores do Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH),
17 transplantados, pacientes sob o uso de corticosteroides, imunossupressores e quimioterápicos,
18 e ainda aqueles que possuem alterações endócrinas, neonatos e os clinicamente enfermos
19 devido ao uso de cateter (MOREIRA et al., 2002; ALANGADEN, 2011; LOPES;
20 NOGUEIRA; LOPES, 2012). Sendo assim, a candidíase é considerada uma micose
21 oportunista, devido ao fato de aproveitar-se das condições de desequilíbrio fisiológico do
22 hospedeiro para se tornar patogênica (BARBEDO; SGARBI, 2010).

23 A quantidade de fármacos que atuam no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas
24 é restrita. Nos últimos anos, fármacos como anfotericina B e os azóis (principalmente
25 fluconazol, cetoconazol e itraconazol) têm sido empregados como fármacos de primeira
26 escolha no tratamento das infecções fúngicas sistêmicas, os quais atuam na membrana celular
27 do fungo interferindo na metabolização do ergosterol, composto estrutural lipídico presente na
28 membrana plasmática dos fungos (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

29 Devido ao aumento de casos de infecções causadas por representantes do gênero
30 *Candida* e à conseqüente utilização excessiva de medicamentos no tratamento desse tipo de
31 infecção, houve o favorecimento da resistência dos micro-organismos frente aos
32 medicamentos tradicionalmente utilizados (KHAN et al., 2010). Além disso, somando-se o
33 fato de que as espécies deste gênero são os isolados mais comumente encontrados e os relatos
34 de altas taxas de morbidade e mortalidade relacionadas ao gênero e a espécie *C. parapsilosis*,

1 e ao fato dos antimicrobianos de origem vegetal não possuírem exorbitantes efeitos adversos e
2 terem amplo potencial terapêutico para o tratamento de muitas infecções, faz-se necessário a
3 busca por novas alternativas de tratamento para as doenças oriundas desses agentes
4 infecciosos a partir de produtos naturais (CASTRO; LIMA, 2011).

5 Dentre algumas plantas que estão sendo estudadas por suas capacidades
6 antimicrobiana e antifúngica, destaca-se a *Curcuma longa*, planta herbácea, popularmente
7 conhecida como açafrão, nativa do sudeste da Ásia, pertencente à família Zingiberaceae, a
8 qual é amplamente utilizada na culinária como condimento devido ao seu aroma e sabor
9 característico, bem como sua coloração amarelo-alaranjado (ALMEIDA, 2012; FEDES;
10 GONÇALVES, 2014). A planta é composta principalmente por pigmentos curcuminoides,
11 dentre eles tem-se em destaque Desmetoxicurcumina, Bisdesmetoxicurcumina, e a
12 Curcumina, sendo este último, um polifenólico que caracteriza a coloração amarela dos
13 rizomas de *C. longa*, além de promover atividade farmacológica, como antioxidante, anti-
14 inflamatória, antiviral frente ao vírus da hepatite B, antineoplásica, hipolipidêmica, induz a
15 apoptose, atua sobre a icterícia, entre outras (BACHMEIER, 2008; PÉRET-ALMEIDA et al.,
16 2008; KIM et al., 2009; BENGMARK et al., 2009).

17 Estudos demonstram atividade antimicrobiana desta planta contra *Staphylococcus*
18 *aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aureuginosa*,
19 *Streptococcus*, *Salmonella enteritidis*, *Aspergillus flavus*, *Enterococcus faecalis*, *C.*
20 *parapsilosis*, entre outros (PAIM, 2010; SINDHU et al., 2011; FEDES; GONÇALVES, 2014;
21 PACHECO et al., 2015).

22 Assim, diante dos resultados obtidos em estudos preliminares que demonstraram a
23 capacidade inibitória de *C. longa* sobre *C. parapsilosis*, análises em busca dos efeitos
24 causados por essa planta ao fungo referido se tornam relevantes na busca por novas terapias.

25 O presente trabalho teve por objetivo verificar possíveis mecanismos de ação de *C.*
26 *longa* sobre *C. parapsilosis*. Assim, foram investigados danos morfológicos, mitocondriais e
27 quanto a integridade do DNA do fungo. Em adição, foi analisado os efeitos dos presentes
28 extratos na membrana plasmática e na parede celular.

31 **METODOLOGIA**

32 Trata-se de um estudo de caráter quali-quantitativo, de abordagem indutiva, com
33 procedimento comparativo estatístico e técnica de documentação direta em laboratório.

1 **Coleta do material vegetal**

2 A coleta de folhas e rizomas de *C. longa* foi realizada de acordo com Pacheco e
3 colaboradores (2015), na cidade de Pilar de Goiás - GO, situada na região do Vale do São
4 Patrício (coordenadas geográficas 14°45'55''S; 49°34'55''O) e posteriormente foram
5 armazenadas no laboratório de Microbiologia das Faculdades Facer - Unidade Ceres – GO.

7 **Obtenção dos extratos de *C. longa***

8 A obtenção dos extratos de *C. longa* foi realizada de acordo com Pacheco e
9 colaboradores (2015), com modificações. As folhas (secas a temperatura ambiente) e os
10 rizomas (secos em estufa a 30°C) de *C. longa* foram triturados e macerados em etanol e
11 metanol (proporção 1:3) e, após esse processo, armazenados em frascos escuros sob
12 refrigeração. Posteriormente, essa amostra foi filtrada e seca em chapas térmicas com agitação
13 do solvente. O extrato resultante foi armazenado em um frasco âmbar ao abrigo da luz, à 4°C.

15 **Cultivo e manutenção do fungo**

16 Para a realização do cultivo, foi utilizado a cepa de *C. parapsilosis* ATCC (*American*
17 *Type Culture Collection*- 22019) mantida em estufa a 37° C em meio Ágar Saboraud Dextrose
18 (Peptona 10g/L; Dextrose 40g/L; Ágar 15g/L), meio recomendado para o cultivo de leveduras
19 e fungos patogênicos (LACAZ et al., 1998). A cepa de *C. parapsilosis* foi mantida em estufa
20 a 37°C por 72 horas, quando foi submetida à experimentação ou novo repique (MENEZES et
21 al., 2012; PACHECO et al., 2015).

23 **Investigação do dano morfológico dos diferentes extratos de *C. longa* sobre as células** 24 **leveduriformes de *C. parapsilosis***

25 Para se investigar o efeito dos extratos de *C. longa* sobre a morfologia de *C.*
26 *parapsilosis*, amostras contendo 1×10^4 como concentração de células do fungo com três dias
27 de crescimento em meio Nutriente (Animal tissue 5.00g/l; Beef extract 1.50g/l; yeast extract
28 1.50g/l; Sadium chlorde 5.00g/; PH final: $7,4 \pm 0,2$ a 25°C; MARCA: Himedia) suplementado
29 com glicose, foram transferidas para tubos de ensaio contendo meio Nutriente líquido somado
30 aos extratos de *C. longa* nas concentrações de 500 ppm. Simultaneamente foi realizado
31 controle negativo. Após 5 dias de incubação a 37°C, o material foi encaminhado ao
32 microscópio óptico, para análise das alterações celulares das leveduras. As imagens foram
33 obtidas por sistema de captura de imagens em microscópio Coleman AC 85-265v (BETONI
34 et al., 2006), com modificações.

1 **Avaliação da atividade de *Curcuma longa* sobre a parede celular e membrana**
 2 **plasmática de *Candida parapsilosis***

3 Os ensaios foram realizados através da técnica de microdiluição seriada dos extratos,
 4 seguindo recomendações do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), como mostra
 5 a Figura 1. Para determinar a CIM (Concentração Inibitória Mínima) de *C. longa* (rizomas e
 6 folhas), 1×10^4 células de *Candida parapsilosis* em meio líquido RPMI 1640 contendo os
 7 extratos da planta, foram expostas na presença de sorbitol a 0,8 M, o qual é um osmoprotetor
 8 da parede celular durante o crescimento de leveduras oportunistas e em outros poços da
 9 mesma placa foram adicionados previamente 400 $\mu\text{g/mL}$ de ergosterol, substância presente na
 10 membrana plasmática fúngica e também o emprego da *C. parapsilosis* em meio líquido RPMI
 11 1640 ausente de extratos de *C. longa* e dos reagentes anteriormente citados. Posteriormente,
 12 as placas foram seladas em condições assépticas e incubadas a 37°C e a leitura realizada em
 13 espectrofotômetro após 48 horas de incubação. Os ensaios foram realizados em triplicata e o
 14 resultado expresso pela média da absorbância a 560 nm. Para comparação, a CIM na ausência
 15 de sorbitol e ergosterol foi realizado o controle contendo fungo e os extratos.



16
 17 **Figura 1:** Demonstração do ensaio de extratos de folhas e rizomas de *C. longa* na presença de
 18 sorbitol e ergosterol em placa de microdiluição.

19
 20 **Avaliação da atividade de *Curcuma longa* sobre a inibição da atividade mitocondrial de**
 21 ***Candida parapsilosis***

1 A determinação da concentração inibitória da atividade mitocondrial foi realizada
2 baseada na técnica de CIM por microdiluição seriada de *Curcuma longa* (extrato de rizomas e
3 folhas) colocado na presença de 1×10^4 células de *C. parapsilosis*. O meio de cultura utilizado
4 foi o meio líquido RPMI 1640. As placas foram incubadas a 37°C e a leitura realizada após 24
5 horas de incubação, 15 μL da solução de resazurina a 0,02% foi adicionado em cada poço,
6 sendo a placa novamente incubada. Os ensaios foram realizados em triplicata e a inibição da
7 atividade mitocondrial foi visualizada pela manutenção na cor azul do reagente resazurina.

9 **Avaliação da citotoxicidade pelo Método de Redução do Tetrazólio - MTT**

10 Para avaliar a viabilidade celular após tratamento com os extratos de *C. longa* foi
11 utilizado o Método Colorimétrico de Redução do Tetrazólio (MTT - brometo de (3-[4,5-
12 dimetil-tiazol-2-il] -2,5-difeniltetrazólio - Sigma). O princípio deste método descrito por
13 Mosmann (1983), consiste em medir a viabilidade celular através da atividade enzimática
14 mitocondrial das células vivas, onde há a redução do sal em derivado azul de formazana, o
15 qual é um precipitado formado pela ação da enzima succinato desidrogenase, produto da
16 respiração mitocondrial. Desta forma, este método avalia de forma quantitativa a
17 sobrevivência e proliferação celular, uma vez que, a conversão do MTT em formazana ocorre
18 somente em células vivas e a quantidade do precipitado é proporcional ao número de células
19 vivas (GERLIER; THOMASSET, 1986; FERRATI; FORNASIERO; ISETTA, 1990). O
20 precipitado de formazana apresenta coloração azul e com a adição de um solvente orgânico é
21 possível sua solubilização (DENIZOT; LANG, 1986).

22 Para o teste do MTT, 1×10^8 de células fúngicas foram semeadas em tubos de ensaio
23 na ausência e presença dos extratos de rizomas e folhas de *C. longa* a 500 ppm e incubados
24 em estufa a 37°C . Ao final do período de incubação, foram adicionados 100 μL de MTT na
25 concentração de 2 mg/2,5 ml e novamente incubados durante 4 horas em estufa a 37°C . Após
26 o tempo de incubação foi observado formação de precipitado escuro nas concentrações nas
27 quais células encontravam-se vivas; a solução MTT foi retirada e foram adicionados 100 μL de
28 isopropanol para diluir o precipitado e desta forma realizar a leitura pela alteração da cor do
29 meio de amarelo para violeta. Já no controle positivo do teste foi utilizado, peróxido de
30 hidrogênio. A quantificação da densidade óptica (DO) foi medida em espectrofotômetro com
31 comprimento de onda a 570 nm (GULLO et al., 2012). A porcentagem de células viáveis foi
32 determinada a partir da seguinte fórmula:

$$34 \quad \text{Células viáveis \%} = \text{média do teste} \times 100 / \text{média do controle negativo}$$

1 **Extração do DNA genômico de *C. parapsilosis***

2 O DNA genômico de *C. parapsilosis* foi extraído de acordo com as recomendações de
 3 Sandhu e colaboradores (1995). Para tal, empregou-se 1×10^4 de células fúngicas diluídas em
 4 200 μl de água deionizada estéril tratada com 1% de dietilpirucarbonato (H₂O DEPC).
 5 Consequente, a esse volume foi adicionado 500 μl de tiocianato de guanidina 6M (GTP)
 6 dissolvidos em 50 mM de fenol tamponado em Tris-HCl (pH = 8), mantendo a amostra em
 7 banho-maria (105°C) por 20 minutos. Logo, adicionou-se 250 μl de clorofórmio-álcool-
 8 isoamil (24:1) seguida pela centrifugação, por 15 minutos, a 14.000 rpm. Posteriormente, foi
 9 realizada a adição de 500 μl de isopropanol a 100% à fase aquosa, submetendo a mistura à
 10 temperatura de -20°C por 24 horas. Ao final desse período ocorreu uma nova centrifugação a
 11 14.000 rpm, por 20 minutos, descarte do sobrenadante e adição de 500 μl de etanol a 70%.
 12 Seguido com uma nova centrifugação a 14.000 rpm, por 10 minutos, e ressuspensão do DNA
 13 extraído em 25 μl de H₂O DEPC. Ao final, as diferentes amostras foram separadas por
 14 eletroforese em gel de agarose.

15

16 **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

17 Após a secagem dos rizomas de *C. longa* em estufa a 37°C e das folhas em temperatura
 18 ambiente, os mesmos foram triturados e macerados, e depois foram testados diferentes
 19 solventes para a extração, etanol (Tabela 1) e metanol (Tabela 2), que posteriormente foram
 20 evaporados e a porcentagem de rendimento calculada.

21

22 **Tabela1:** Rendimento dos extratos etanólicos de *C. longa*

23

24 Espécie	Extrato	Massa (g)	EE (g)	Rendimento (%)
25 <i>C. longa</i>	Folhas	2,0000	0,1600	8%
26	Rizomas	2,0000	0,1600	8%

27

*EE= Extrato etanólico

28

29

30 **Tabela 2:** Rendimento dos extratos metanólicos de *C. longa*

31

32 Espécie	Extrato	Massa (g)	EM (g)	Rendimento (%)
33 <i>C. longa</i>	Folhas	2,0000	0,5000	15%
34	Rizomas	2,0000	0,3000	25%

35

*EM= Extrato metanólico

1 Desta forma, para 2 g de folhas e 2 g de rizomas da planta macerados em etanol, o
2 percentual de rendimento de ambos os extratos foi igual a 8%. Já quando macerados em
3 metanol, a porcentagem de rendimento foi superior, sendo 15% para folhas e 25% para
4 rizomas, fato que pôde ser observado, de imediato, pela intensidade da coloração dos extratos
5 obtidos a partir do metanol.

6 Pacheco e colaboradores (2015) utilizaram 1,26 g de folhas e 5,74 g de rizomas no
7 etanol e obtiveram como percentual de rendimento 53,50% e 12,70%, respectivamente. No
8 estudo de Bagchi (2012), o rendimento variou entre 4,49 a 12,89%, utilizando o etanol como
9 solvente. Já Kulkarni e colaboradores (2012), verificaram que o percentual de rendimento
10 variou quando submetido a diferentes solventes, dentre eles, o metanol, clorofórmio, acetona
11 e acetato de etila, os quais obtiveram rendimento de 5,6%, 4,3%, 4,6% e 4,5%,
12 respectivamente.

13 Segundo Arutselvi e colaboradores (2012), em seu estudo, os extratos etanólicos e
14 metanólicos de *C. longa* foram eficazes de maneira similar na inibição dos fungos *Aspergillus*
15 *niger* e *Candida albicans* e das bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia*
16 *marcesens*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pyrogens*. Em
17 contrapartida, foi evidenciado que os extratos etanólicos obtiveram maior rendimento do que
18 os extratos metanólicos e que os rizomas apresentaram maior atividade antimicrobiana
19 quando comparado com as folhas.

20 Neste estudo, os percentuais de rendimentos dos extratos obtidos a partir de metanol
21 foram maiores que aqueles obtidos por etanol, o oposto relatado em muitos estudos, como é o
22 caso de Arutselvi e colaboradores (2012). Foi possível avaliar também que, as taxas de
23 rendimentos encontradas neste estudo estão de acordo com os parâmetros apresentados na
24 literatura.

25 Para a investigação do dano morfológico dos diferentes extratos de *C. longa* sobre as
26 células leveduriformes de *C. parapsilosis*, células fúngicas foram incubadas em meio
27 nutriente contendo extratos a 500 ppm das folhas e rizomas da planta, além do controle sem
28 extrato, os quais foram incubados durante 5 dias sob temperatura de 37°C para análise das
29 alterações celulares das leveduras, conforme mostra a Figura 2 através da captura das
30 imagens.

31
32
33
34

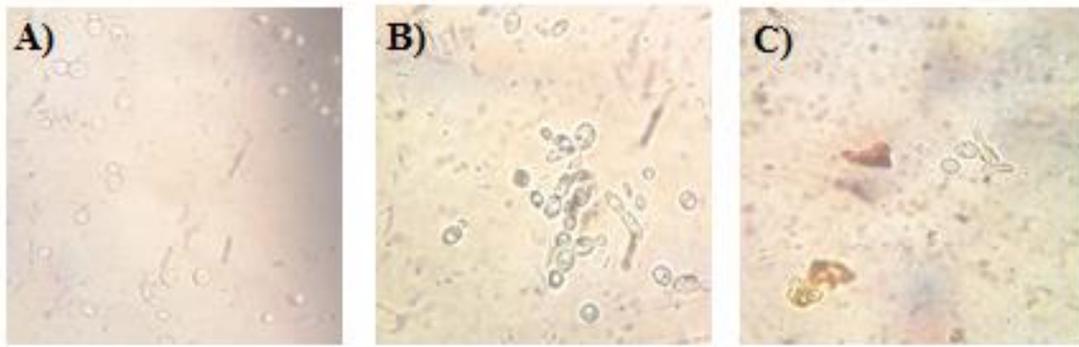


Figura 2: Imagem obtida a partir de microscópio óptico de *Candida parapsilosis* crescida em meio Nutriente por 5 dias (A), *C. parapsilosis* na presença do extrato de folhas a 500 ppm (B) e na presença de 500 ppm do extrato de rizomas (C).

Diante das imagens, observa-se que em ambos os tratados (B) e (C), as células fúngicas mudaram de tamanho, houve agregação celular e diferença quanto à forma e número de células, além de lise e *debris* celular em comparação com células do controle negativo. Uma vez que no tratado com rizomas as alterações foram mais significativas quando comparadas com o tratado com folhas.

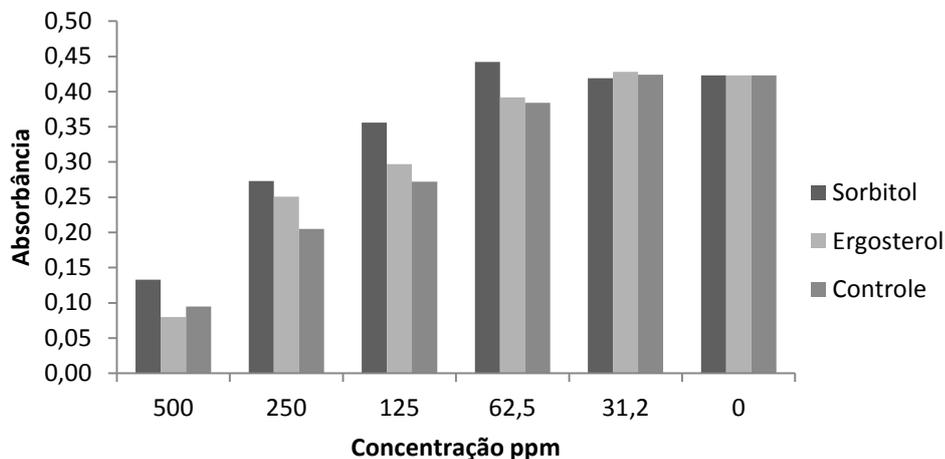
Essa situação também foi evidenciada no estudo de Aziz e colaboradores (2012), que investigaram os efeitos de hidrogel de CD (Chitosan Dextran-Based), composto encontrado no exoesqueleto de crustáceos também chamados de quitosano, sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, os quais foram expostos a 8000 mg e 32000 mg do antimicrobiano respectivamente, e incubados por 3 dias para análise microscópica. Depois de incubados, observaram que houve um aumento da agregação celular em ambos patógenos. No *S. aureus* foi revelado um vazamento dos conteúdos celulares e células com aparência de encolhimento, em comparação com o controle não tratado, já *E. coli* apresentou uma aparência de luz.

Stringaro e colaboradores (2014) observaram alterações morfológicas evidentes causadas pelo óleo essencial de *Mentha suaveleons* (EOMS) em células leveduriformes de *Candida albicans*, bem como, formação de bolhas na parede celular. Algumas células encontravam-se entumecidas e alongadas para formar aglomerados, o que foge do aspecto observado nas células que não foram tratadas, se assemelhando aos resultados obtidos neste estudo.

Isto mostra que, as alterações celulares evidenciadas neste trabalho são análogas à outras descritas na literatura, que utilizaram potenciais agentes antimicrobianos sobre patógenos, o que demonstra que *C. longa* apresenta atividade antimicrobiana semelhante à de antimicrobianos sintéticos e também de outros produtos naturais.

1 Ainda em busca do tipo de dano celular provocado por *C. longa* sobre *C. parapsilosis*,
 2 foi realizada análise do crescimento do fungo na presença dos extratos da planta e de sorbitol
 3 e ergosterol em placas de microdiluição. O sorbitol foi empregado para avaliar possíveis
 4 danos à parede celular de *C. parapsilosis*, uma vez que, o sorbitol atua como um agente
 5 protetor da mesma. Já o ergosterol foi utilizado para avaliar se a *C. longa* tem a capacidade de
 6 inibir a síntese dos esteróis da membrana plasmática do fungo estudado.

7 As placas foram incubadas durante 48 horas com o objetivo de avaliar a interferência
 8 dos extratos das folhas junto ao sorbitol e ergosterol (Figura 3) e da mesma forma para os
 9 rizomas (Figura 4). Posteriormente, as placas foram encaminhadas ao espectrofotômetro e a
 10 média das absorbâncias calculadas e expressas em gráficos.



11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
Figura 3: Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato com folhas de *C. longa*
 22 nas concentrações de 31,2 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm e 500 ppm, acrescidos de
 23 sorbitol (0,8 M) e ergosterol (400 µg/mL), e o controle negativo (ausência de sorbitol,
 24 ergosterol).
 25

26
 27 A Figura 3 mostra a capacidade inibitória (IC) do extrato de folhas de *C. longa* sobre o
 28 fungo, na presença tanto do ergosterol como do sorbitol, percebe-se alteração da CIM (500
 29 ppm) encontrada por Pacheco e colaboradores (2015), sendo possível calcular o IC₅₀,
 30 obtendo-se um valor de 250 ppm, existindo ação de ambos os protetores com maior efeito
 31 observado para o sorbitol (IC₅₀ = 500 ppm), demonstrando que existe dano causado à parede
 32 celular e à membrana (ergosterol IC₅₀ = 250 ppm), entretanto, mais acentuado na parede
 33 celular do fungo devido ao fato do fungo ter sido mais resistente ao sorbitol.
 34

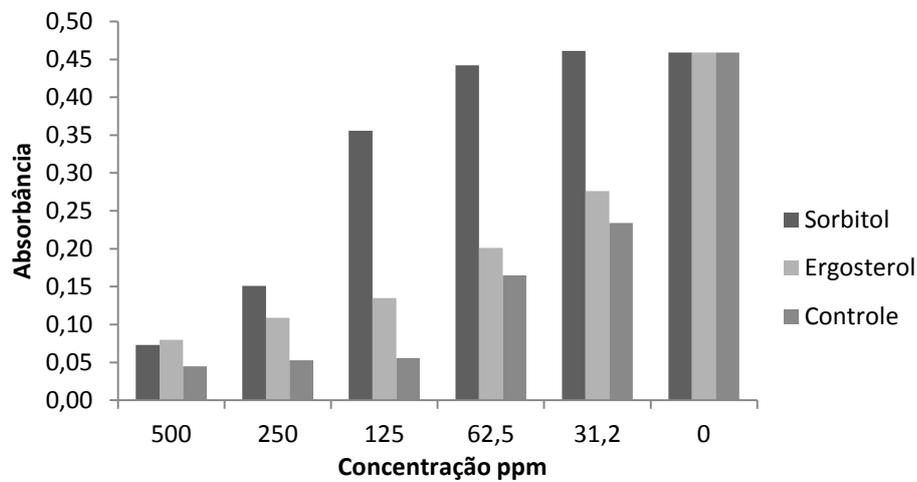


Figura 4: Teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato com rizomas de *C. longa* nas concentrações de 31,2 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm e 500 ppm, acrescidos de sorbitol (0,8 M) e ergosterol (400 $\mu\text{g/mL}$), e o controle negativo (ausência de sorbitol, ergosterol).

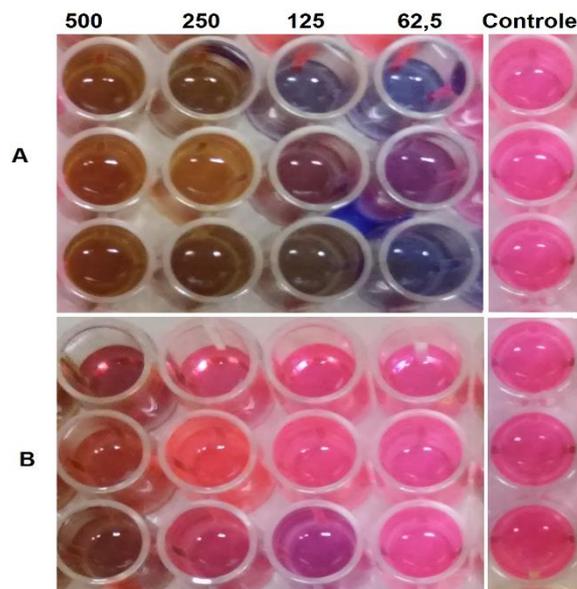
Frente aos resultados obtidos na Figura 4, que demonstram a capacidade inibitória do extrato de rizomas de *C. longa* sobre *C. parapsilosis*, na presença de ergosterol e sorbitol, pode-se observar diminuição da CIM, sendo possível calcular o IC_{50} , obtendo-se um valor de 31,2 ppm, e ainda um proteção maior de sorbitol ($\text{IC}_{50} = 250$ ppm), salientando o dano à parede celular do fungo, apesar de existir, também, dano a membrana plasmática (ergosterol $\text{IC}_{50} = 62,5$ ppm).

Cabe ressaltar que o decréscimo na CIM, em relação ao estudo de Pacheco e colaboradores (2015), pode ser resultado da qualidade do extrato obtido e das características da própria planta, que variam de uma amostragem para a outra. Estudos de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) demonstram diferenças nas quantidades de pigmentos curcuminoides (que podem ser responsáveis pela atividade antifúngica) em diferentes exemplares (PERÉT-ALMEIDA et al., 2008; CAMARGOS; GONÇALVES, 2013), bem como, nas diferenças da metodologia aplicada (testes de micro e macro diluição).

Gerra e colaboradores (2015) realizaram um estudo semelhante onde empregaram a um novo derivado da Cumarina (Cou- NO_2), composto da *C. longa*, para investigar mecanismos de ação desse composto sobre espécies de *Aspergillus* spp. Para tal, o objeto de estudo foi o sorbitol a 0,8 M e ergosterol a 400 $\mu\text{g/ml}$, onde verificaram que a valor da CIM

1 com e sem ergosterol eram idênticas, ou seja, não houve interferência na membrana
 2 plasmática do *Aspergillus* spp., já no ensaio com sorbitol, os valores de CIM do Cou-NO₂
 3 aumentou 4 vezes na presença de sorbitol no meio de cultura quando comparado com meio
 4 sem sorbitol. Isto sugere que Cou-NO₂ atua na parede celular da célula fúngica. Segundo
 5 Widodo e colaboradores (2012), a cumarina age formando poros na parede da célula, com a
 6 consequente liberação de conteúdo citoplasmático e morte celular.

7 Para avaliar se houve interferência de *C. longa* na atividade mitocondrial de *C.*
 8 *parapsilosis*, placas contendo diferentes concentrações dos extratos de folhas e rizomas foram
 9 incubadas a 37°C durante 24 horas contendo o reagente resazurina a 0,02%, foram retiradas
 10 da estufa e, posteriormente, foi realizado a captura de imagem para análise como mostra a
 11 Figura 5.



12
 13 **Figura 5:** Avaliação da atividade mitocondrial de *C. parapsilosis* após exposição das células
 14 fúngicas aos extratos de rizomas (31,2 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm e 500 ppm) e
 15 resazurina (0,02%) (A) e folhas (31,2 ppm, 62,5 ppm, 125 ppm, 250 ppm e 500 ppm) e
 16 resazurina (0,02%) (B) de *C. longa*. Como controle negativo foram empregados células na
 17 ausência de extratos de *C. longa*.

18
 19 Este método baseia-se na detecção de alterações colorimétricas causadas pela oxidação
 20 (azul) e redução (rosa), capacidades do reagente resazurina. Este teste é um indicador para a
 21 função metabólica celular, sendo este um teste simples, sensível, rápido e barato. Sendo
 22 assim, ao analisar os poços, percebe-se que no tratado com rizomas houve inibição da
 23 atividade mitocondrial obtendo-se uma CIM no valor de 62,5 ppm. Já no tratado com folhas,

1 o valor obtido da CIM foi de 500 ppm, o que demonstra redução da atividade mitocondrial do
2 fungo na presença de ambos os extratos, sendo o extrato de rizomas ainda mais efetivo. A
3 análise colorimétrica foi confirmada pelo teste quantitativo do MTT, onde analisou-se a
4 atividade mitocondrial de *C. parapsolisis* frente à 500 ppm de extratos das folhas e rizomas,
5 obtendo-se uma porcentagem da atividade de 100% e 44,5%, respectivamente.

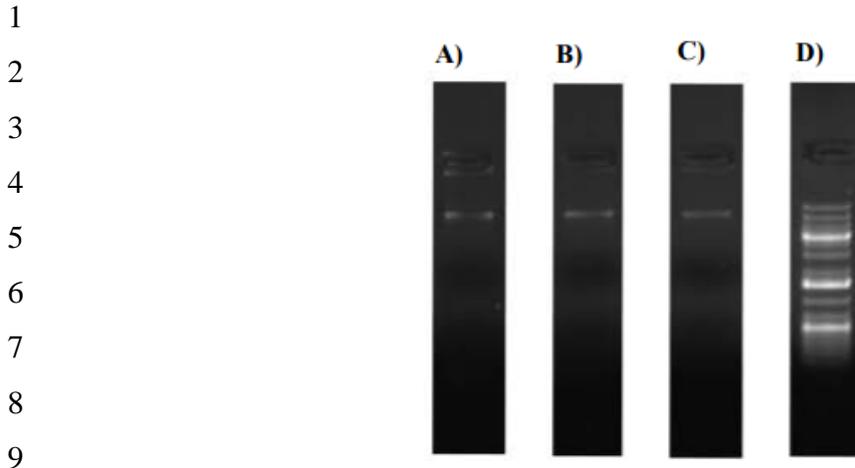
6 Affolabi e colaboradores (2008) realizaram um estudo para avaliar a atividade
7 mitocondrial do *Mycobacterium tuberculosis* após o contato com isoniazida e rifampicina nas
8 concentrações de 1,0 a 0,03 g/ml e 2,0 a 0,06 g/ml, respectivamente, os quais foram incubados
9 em placas contendo 96 poços a 37°C durante 7 dias. Após o período de incubação, 30 µl de
10 solução de resazurina foi adicionado a cada condição. A maioria das cepas resistentes
11 apresentaram um valor de CIM de 2 mg para rifampicina e 1 mg para isoniazida, enquanto
12 que a maioria de cepas sensíveis teve CIM de 0,06 mg para rifampicina e 0,03 para isoniazida.

13 Mohammad e colaboradores (2010) investigaram a atividade citotóxica da *Curcuma*
14 *longa* sobre a atividade da telomerase na linhagem celular A549 (linhagem de células
15 cancerígenas localizadas nos pulmões), onde as análise dos dados do ensaio de citotoxicidade
16 demonstrou que IC₅₀ sobre células de câncer é de 0,28, 0,27 e 0,23 mg / ml durante 24, 48 e
17 72 horas, respectivamente, durante os ensaios de MTT, onde somado com outros ensaios,
18 chegaram à conclusão de que a *C. longa* tem atividade citotóxica e inibitória nas células
19 cancerígenas da linhagem A549 e pode ser explorada como forte potencial para o
20 desenvolvimento de novas drogas contra o câncer de pulmão. Da mesma forma, Shi e
21 colaboradores (2006) utilizando este mesmo método, mostraram que a curcumina inibe o
22 crescimento do epitélio do ovário humano (linhagem celular de câncer Ho-8910) *in vitro* por
23 52% para 48 horas de exposição.

24 Desta maneira, a medida que a CIM diminui na presença do reagente resazurina, maior
25 é a inibição da atividade mitocondrial de um potencial agente terapêutico sobre o patógeno de
26 estudo.

27 Por fim, em busca de dano ao material genético, foi analisado o perfil eletroforético do
28 DNA genômico de *C. parapsolisis* após exposição, por 24 horas, aos extratos de folhas e
29 rizomas de *C. longa* (Figura 6).

30
31
32
33
34



10 **Figura 6:** Perfil eletroforético para avaliação do dano ao DNA genômico de *C. parapsilosis*
11 após exposição aos extratos de folhas (A) e rizomas (B) de *C. longa*. Em (C) controle e (D)
12 marcador 1Kb thermo scientific.

13

14 Pôde-se observar que, após exposição à CIM na concentração de 500 ppm dos extratos
15 de folhas e rizomas de *C. longa*, determinada por Pacheco e colaboradores (2015), não houve
16 nenhum tipo de dano ao DNA do fungo. Em estudo realizado por Mahl (2014), que avaliou o
17 dano ao DNA de *C. glabrata* causado por fluconazol, concentrações sub-inibitórias do
18 composto foram suficientes para causar degradação aparente, o que demonstra, que *C. longa*,
19 nas condições testadas não é efetiva genotoxicamente contra *C. parapsilosis*.

20

21 **CONCLUSÃO**

22 Estudos anteriores demonstraram a atividade antiproliferativa dos extratos de folhas e
23 rizomas de *C. longa* sobre células de *C. parapsilosis*. Na busca pelo tipo de dano induzido por
24 esses extratos, concluiu-se que ambos provocam alterações na morfologia do fungo, sendo
25 que o dano à parede celular é ainda maior do que o dano provocado à membrana plasmática.
26 Observou-se também, redução na atividade mitocondrial fúngica. Todos esses danos foram
27 causados, com maior efetividade, pelo extrato obtido a partir dos rizomas da referida planta.
28 Ambos os extratos não induzem dano ao DNA genômico do fungo. Diante do exposto, fica
29 clara a capacidade antifúngica dos extratos de *C. longa* sobre o fungo estudado, sendo
30 elucidadas algumas de suas vias de ação. Posto que, são necessários mais testes na busca por
31 novos candidatos a fármacos, mas importantes conclusões foram acertadas a partir deste
32 estudo.

33

34

1 AGRADecIMENTOS

2 Os autores agradecem a valiosa contribuição das professoras Msc. Amanda Gregorim
3 Fernandes e Msc. Lívia do Carmo Silva, não só pelo fornecimento de suporte técnico, mas
4 também pelo apoio à pesquisa e indiscutível massa crítica, indispensáveis na execução deste
5 trabalho.

6

7 BIBLIOGRAFIA

8

9 AFFOLABI, D.; SANOUSI, N.; ODOUN, M.; MARTIN, A.; KOUKPEMEDJI, L.;
10 PALOMINO, J.C.; KESTENS, L.; ANAGONOU, S.; PORTAELS, F. Rapid detection of
11 multi drug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Cotonou (Benin) using two low-cost
12 colorimetric methods: resazurin and nitrate reductase assays. **Journal of Medical**
13 **Microbiology**, v. 57, p. 1024-1027, 2008.

14

15

16 ALANGADEN; G.J.; Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control and
17 prevention. **Infectious Clinics of North America**, v. 25, p. 201-225, 2011.

18

19

20 ALMEIDA, M.C.; **Efeitos do processamento por radiação em espécies da família**
21 **Zingiberaceae: Açafrão (*Curcuma longa* L.), Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) e**
22 **Zedoária (*Curcuma zedoaria* (Christm.) Roscoe). 2012. Tese de Doutorado. Universidade**
23 **de São Paulo.**

24

25

26 ARUTSELVI, R.; BALASARAVANAN, T.; PONMURUGAN, P.; SARANJI N.M.;
27 SURESH, P. Phytochemical screening and comparative study of antimicrobial activity of
28 leaves and rhizomes of turmeric varieties. **Asian Journal of Plant Science and Research**,
29 v.2, n. 2, p. 212-219, 2012.

30

31

32 AZIZ, M.A.; CABRAL, J.D.; BROOKS, H.J.L.; MORATTI, S.C.; HANTON, L.R.;
33 Antimicrobial Properties of a Chitosan Dextran-Based Hydrogel for Surgical Use.
34 **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 16, n. 1, 2012.

35

36

37 BACHMEIER; B.E.; MOHRENZ, I. V.; MIRISOLA, V.; SCHLEICHER, E., Romeo, F.;
38 HÖHNEKE, C. JOCHUM, M.; NERLICH, A. G.; PFEFFER, U. Curcumin down regulates
39 the inflammatory cytokines CXCL1 and – 2 in breast cancer cells via NFkB. **Carcinogenesis**,
40 v. 29, n. 4, p. 779-789, 2008.

41

42

43 BAGCHI, A. Extraction of Curcumin. **Journal of Environmental Science, Toxicology and**
44 **Food Technology**, v.1, p.2319-2402, 2012.

45

46

- 1 BARBEDO, L.S.; SGARBI, D.BG. Candidíase. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.**, v. 22, p. 22-
2 38, 2010.
3
4
- 5 BENGMARK, S.; MESA, M.D.; GIL, A. Plant-derived health – the effects of tumeric and
6 curcuminoids. **Nutri Hosp.**, v. 24, n. 3, p. 273-281, 2009.
7
8
- 9 BERGOLD, A.M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão.
10 **Revista Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.
11
12
- 13 BETONI, J.E.C.; MANTOVANI, R.P.; BARBOSA, L.N.; STASI, L.C.D.; JUNIOR, A.F.
14 Synergism Between Plant Extract and Antimicrobial Drugs Used on *Staphylococcus aureus*
15 diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 101, p. 387-390, 2006.
16
17
- 18 CALDERONE, R.A. Introduction and historical perspectives. **Candida and Candidiasis**.
19 (Calderone R., ed), p. 15–25. ASM Press, Washington, DC, 2002.
20
21
- 22 CAMARGOS, V.R.; GONÇALVES, G.M.S. Estudo da penetração cutânea in vitro de
23 curcumina, a partir de formulações de uso tópico. IN: Encontro de Iniciação Científica, XVIII,
24 2013, Campinas – SP (Anais).
25
26
- 27 CASTRO, R.D.; LIMA, E.O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea*
28 *odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Rev. Bras. Pl.**
29 **Med.**, v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.
30
31
- 32 COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUÉR, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.;
33 MATTA, D.A; WARNOCK, D.; MORGAN, J. Brazilian Network Candidemia Study.
34 Epidemiology of candidemia in Brazil: a Nationwide sentinel surveillance of candidemia in
35 eleven medical centers. **J. Clin. Microbiol.**, v. 44, p. 2816-2823, 2006.
36
37
- 38 COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; PINA-VAZ, C.; MENDONÇA, D.; RODRIGUES, A.G. A first
39 Portuguese epidemiological survey of fungaemia in a university hospital. **Eur. J. Clin.**
40 **Microbiol.**, v. 27, p. 365–374, 2008.
41
42
- 43 DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell grow thand survival.
44 Modifications to the tetrazolium dye procedure givin gim proved sensitivity and reliability. **J.**
45 **Immunol. Methods**, v. 89, n. 2, p. 271-7, 1986.
46
47
- 48 FEDES, G.R.; GONÇALVES, G.M.S. Estudo da atividade antimicrobiana de subprodutos
49 provenientes dos rizomas de *Curcuma longa*. IN: Encontro de Iniciação Científica, XIX,
50 2014, Campinas - SP.

1 FERRARI, M.; FORNASIERO, M. C.; ISETTA, A. M. MTT colorimetric assay for testing
2 macrophage cytotoxicactivity in vitro. **J. Immunol. Methods**, v. 131, n. 2, p. 165-72, 1990.

3
4
5 GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cellactivation.
6 **J.Immunol. Methods**, v. 94, n. 1-2, p. 57-63, 1986.

7
8
9 GERRA, F.Q.S.; ARAÚJO, R.S.A.; SOUSA, J.P.; PEREIRA, F.O.; MENDONÇA-JUNIOR,
10 F.J.B.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O. Evaluation of Antifungal Activity and Mode of
11 Action of New Coumarin Derivative, 7-Hydroxy-6-nitro-2H-1-benzopyran-2-one, against
12 *Aspergillus* spp. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1-
13 8, 2015.

14
15
16 GOMES, C.L.; CAVALCANTE, J.E.; CUNHA, F.A.; AMORIM, L.N.; MENEZES, E.A.
17 Identificação e perfil de sensibilidade de *Candida* spp. isoladas de urina de pacientes com
18 Candidúria em Iguatu-Ceará. **RBAC**, v. 42, n. 3, p. 223-225, 2010.

19
20
21 GULLO, F.P.; SARDI, J.C.; SANTOS, V.A.; SANGALLI-LEITE, F.; PITANQUI, N.S.;
22 ROSSI, S.A.; SILVA, A.C.P.; SOARES, L.A.; SILVA, J.F.; OLIVEIRA, H.C.; FURLAN,
23 M.; SILVA, D.H.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.
24 Antifungal Activity of Maytenin and Pristimerin. **Evidence-Based Complementary and**
25 **Alternative Medicine**, v. 2012, p. 101-108, 2012.

26
27
28 KIM, H.J.; YOO, H.S.; KIM, J.C.; PARK, C.S.; CHOI, M.S.; KIM, M.; CHOI, H.; MIN, J.S.;
29 KIM, Y.S.; YOON, S.W.; AHN, J.K. Antiviral effect of *Curcuma longa* Linn extract against
30 hepatitis B vírus replication. **J. Ethnopharmacol**, v. 124, p. 189-196, 2009.

31
32
33 KHAN, R.; ZAKIR, M.; AFAQ, S.H.; LATIF, A.; KHAN, A.U. Activity of solvent extracts
34 of *Prosopis spicigera*, *Zingiber officinale* and *Trachyspermum ammi* against multidrug
35 resistant bacterial and fungal strains. **J. Infect. Dev. Ctries.**, v. 4, n. 5, p. 292-300, 2010.

36
37
38 KULKARNI, S.J.; MASKE, K.N.; BUDRE, M.P.; MAHAJAN, R.P. Extraction nad
39 Purification of curcuminoids from Turmeric (*Curcuma longa* L.). **International Journal of**
40 **Pharmacology and Pharmaceutical Technology**, v.1, p. 2277-3436, 2012.

41
42
43 LACAZ, C.S.; PORTO, E.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Guia para**
44 **identificação: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo: Sarvier, 1998.

45
46
47 LOPES, I.A.; NOGUEIRA, D.N.; LOPES, I.A. Manifestações Orais Decorrentes da
48 Quimioterapia em Crianças de um Centro de Tratamento Oncológico. **Pesq. Bras.**
49 **Odontoped. Clin. Integr.**, v. 12, n. 1, p. 113-119, 2012.

50

1 MAHL, C.D. **Geração de espécies reativas por fluconazol em *Candida glabrata*: ativação**
2 **de enzimas antioxidantes e dano oxidativo no DNA.** 2014. Dissertação - Programa de Pós-
3 graduação em Biologia Celular e Molecular pela UFRGS, Porto Alegre.

4
5
6 MENEZES, E.A.; JUNIOR, A.A.V.; CUNHA, F.A.; CUNHA, M.C.S.O.; BRAZ, B.H.L.;
7 CAPELO, L.G.; SILVA, C.L.F. Identificação Molecular e suscetibilidade antifúngica de
8 *Candida parapsilosis* isoladas no Ceará, Brasil. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 48, n. 6, p. 415-
9 420, 2012.

10
11
12 MOREIRA, A.C.A.; FALCÃO, A.F.P.; ANDRADE, A.P.; DE SOUZA, E.R. Isolamento de
13 *Candida parapsilosis* em paciente com diagnóstico clínico de candidíase atrófica crônica. **R.**
14 **Ci. Méd. Biol.**, v. 1, n. 1, p. 124-128, 2002.

15
16
17 MOHAMMAD, P.; NOSRATOLLAH, Z.; MOHAMMAD, R.; ABBAS, A.; JAVAD, R. The
18 inhibitory effect of *Curcuma longa* extract on telomerase activity in A549 lung cancer cell
19 line. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 6, p. 912-919, 2010.

20
21
22 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival - application to
23 proliferation and cyto-toxicity assays. **J. Immunol. Methods**, v. 16, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

24
25
26 PACHECO, D.R.; SOARES, D.E.D.; NETO, C.M.S.; SILVA, G.A.; PRADO, R.S.
27 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE *Curcuma longa* SOBRE *Candida*
28 *parapsilosis*. **Rev. Patol. Trop.**, v. 44, n. 3, p. 258-270, 2015.

29
30
31 PAIM, M.P. **Avaliação antibacteriana *in vitro* de extratos etanólicos de açafrão-da-terra**
32 **(*Curcuma longa* L.) frente a microorganismos transmissíveis por alimentos.** Dissertação
33 de Mestrado em Ciências Veterinárias, UFRS, Porto Alegre - RS, 2010.

34
35
36 PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C.C.; NUNAN, E.A.; JUNQUEIRA, R.G.; GLÓRIA,
37 M.B.A.; Atividade antimicrobiana *in vitro* do rizoma em pó, dos pigmentos curcuminoides e
38 dos óleos essenciais da *Curcuma longa* L. **Ciênc. Agrotec. Lavras**, v. 32, n. 3, p. 875-881,
39 2008.

40
41
42 SANDHU, G.S.; KLINE, B.C.; STOCKMAN, L.; ROBERTS, G.D. Molecular probes for
43 diagnosis of fungal infections. **J. Clin. Microbiol.**, v. 33, n. 11, p. 2913-2919, 1995.

44
45
46 SHI, M.; CAI, Q.; YAO, L.; MAO, Y.; MING, Y.; OUYANG, G. Antiproliferation and
47 apoptosis induced by curcumin in human ovarian cancer cells. **Cell. Biol. Int.**, v. 30, n. 3, p.
48 221-226, 2006.

49

1 SINDHU, S.; CHEMPAKAM, B.; LEELA, N.K.; BHAI, S. Chemoprevention by essential oil
2 of turmeric leaves (*Curcuma longa* L.) on the growth of *Aspergillus flavus* and aflatoxin
3 production. **FoodChem Tox.**, v. 49, p. 1188-1192, 2011.

4
5
6 STRINGARO, A.; VAVALA, E.; COLONE, M.; PEPI, F.; MIGNOGNA, G.; GARZOLI, S.;
7 CECCHETI, S.; RAGNO, R.; ANGIOLELLA, L. Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil
8 Alone or in Combination with Other Drugs in *Candida albicans*. **Evidence-Based
9 Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p.1-9, 2014.

10
11
12 TROFA, D.; GÁCSER, A.; NOSANCHUK, J. *Candida parapsilosis*, na emerging fungal
13 pathogen. **American Society for Microbiology**, v. 21, p. 606-625, 2008.

14
15
16 WIDODO, G.P.; SUKANDAR, E.Y.; ADNYANA, I.K.; SUKRASNO, S. Mechanism of
17 Action of Coumarina gainst *Candida albicans* by SEM/TEM Analysis. **ITB Journal Science**,
18 v. 44, n. 2, p. 145-151, 2012.

19