

RESSALVA

Atendendo solicitação do autor, o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 27/03/2022.

Veridianna Camilo Pattini

**Investigação de análogos de curcumina como agentes contra fungos
causadores de dermatomicoses**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Câmpus de São José do Rio Preto.

Financiadora: CAPES – Código 001
FAPESP – Processo 2018/08994-9

Orientador: Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
Coorientadora: Prof. Dra. Margarete Teresa Gottardo de Almeida

São José do Rio Preto
2020

P321i

Pattini, Veridianna Camilo

Investigação de análogos de curcumina como agentes contra fungos causadores de dermatomicoses / Veridianna Camilo Pattini. -- São José do Rio Preto, 2020
64 p. : il., tabs.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências Letras e Ciências Exatas, São José do Rio Preto

Orientadora: Luis Octavio Regasini

Coorientadora: Margarete Teresa Gottardo de Almeida

1. Curcumina. 2. Curcuminoides. 3. Atividade Antifúngica. 4. Dermatófitos. 5. Candida sp.. I. Título.

AGRADECIMENTOS

Na vida só evoluímos e alcançamos grandes sonhos por intermédio de outros. Claro que para tudo existe esforço próprio, porém, nada se faz só e nada se cria só – Somos a somatória de cada pessoa que atravessou as nossas vidas, de forma passageira ou duradoura.

Neste trabalho não poderia ser diferente. Se hoje estou num patamar mais alto na escada de minha vida, foi porque tive o privilégio e a benção de ter pessoas magníficas ao meu lado, me auxiliando dia após dia a subir mais um degrau.

Primeiro, agradeço a grande força espiritual que me rege e me ilumina. Agradeço por ter sido tão privilegiada em minha vida terrena, rodeada de grande pessoas, amigos e familiares. Por ter nascido em uma família maravilhosa.

Sou muito grata aos meus pais que me criaram com tanto apreço, me proporcionando o melhor que poderiam me oferecer. Ao meu pai Walter Pattini (*In memoriam*), que foi homem, pai e professor admirável, o qual me orgulho tanto por ter tido a oportunidade de ser sua filha e aluna, por ter o privilégio de ser bem encaminhada para a vida e para o mundo acadêmico. Como diria Machado de Assis, em frases que te descrevem bem e que nunca me saem da cabeça:

"(...) tu que foste o *compelle intrare* com que um velho mestre, ossudo e calvo, me incutiu no cérebro o alfabeto, a prosódia, a sintaxe, e o mais que ele sabia (...) quem me dera ter ficado sob o teu jugo, com a minha alma imberbe, as minhas ignorâncias, e o meu espadim (...) Que querias tu, afinal, meu velho mestre de primeiras letras? Lição de cor e compostura na aula; nada mais, nada menos do que quer a vida, que é das últimas letras."

A minha mãe Joana D'arc Camilo Pattini, mulher forte, guerreira e determinada, assim como representa o seu nome, que me ensinou e continua me ensinando que mesmo diante as adversidades que enfrentamos na vida devemos ser gratos acima de tudo. Aos meus irmãos Riccieri Pattini e Ricardo Pattini Neto, que por serem irmãos mais velhos, sempre me cuidaram e me amaram, cada um com sua maneira. Que com suas personalidades distintas me ensinaram e continuam a me ensinar diferentes pontos de vista acerca do mundo e da vida.

Agradeço ao meu namorado Pedro Cristiano da Rocha Zancan, por sempre estar ao meu lado sendo meu melhor amigo, meu suporte e parceiro de todas as horas.

Agradeço a todos os professores que estiveram comigo desde o primário, adolescência, universidade e pós graduação. Obrigada pela luta diária e continuem lutando, pois graças a vocês que somos formadores de opinião.

Agradeço a todos meus amigos queridos da minha cidade amada e admirável que é Ilha Solteira - o meu berço e meu refúgio.

Agradeço a UNESP, minha universidade do coração desde a minha graduação, a qual tenho tanto orgulho por fazer parte. Fiz grandes amigos para a vida e tive a oportunidade de ter professores de excelência. Agradeço aos meus professores, em especial a minha orientadora de Iniciação Científica Professora Dra. Heloisa Alves do Prado que foi através de sua oportunidade que conheci a minha paixão pela microbiologia e também foi através dela que fui apresentada ao meu atual orientador Professor Dr. Luis Octávio Regasini e fazer parte deste lindo projeto.

Agradeço ao professor Luis Octavio pela oportunidade que me concedeu para fazer parte deste projeto e por cada “puxão de orelha” ao longo deste caminho que me fez sair da zona de conforto, do raso e mediano, para procurar sempre a minha melhor versão. Graças a ele também pude conhecer a minha co-orientadora Professora Dra. Margarete Tereza Gottardo de Almeida a qual também sou extremamente grata.

Agradeço a professora Margarete por me conceder a oportunidade de fazer grande parte deste projeto em seu laboratório, no qual fui sempre recepcionada de braços abertos por pessoas muito queridas, iluminadas e dispostas a ajudar.

Agradeço a cidade de São José do Rio Preto ter me proporcionado tanto – Sou grata a todas as pessoas que conheci e convivi neste período de três anos. Ao IBILCE, por todas oportunidades; À República Tilangas, que me acolheu e foi minha família durante os meus anos de estadia; Aos laboratórios: Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos e Laboratório de Microbiologia, nos quais pude conhecer pessoas incríveis e amigos para vida, que me auxiliam sempre quando necessário, sem ao menos hesitar.

Aos professores Dr. João Paulo Zen e Dr. Matheus Aparecido dos Santos Ramos por participarem da banca examinadora de qualificação, que contribuíram para a melhoria deste projeto.

Aos membros da comissão examinadora deste trabalho, Dra Cátia Rezende e Dra. Márcia Maria Costa Nunes Soares e, pelo aceite do convite às pressas e justo neste tempo tão incerto o qual

estamos enfrentando mundialmente e por desprenderem tempo na correção deste trabalho, certamente agregando muito conhecimento ao mesmo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, professores, coordenadores e equipe técnica, pela disponibilidade e dedicação aos alunos.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que acreditaram no meu potencial. Aos amigos e familiares – À todos aqueles que contribuíram com a minha formação, não só acadêmica, mas como pessoa, como ser humano. Preferi não citar muita gente, mas creio que todos certamente sabem o quanto sou profundamente grata pela existência de vocês em minha vida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001 e da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP, processo 2018/08994-9, as quais agradeço por financiarem e tornarem possível a realização deste projeto.

EPÍGRAFE

“De tudo, ficaram três coisas: a certeza de que ele estava sempre começando, a certeza de que era preciso continuar e a certeza de que seria interrompido antes de terminar. Fazer da interrupção um caminho novo. Fazer da queda um passo de dança, do medo uma escada, do sono uma ponte, da procura um encontro.”

Fernando Tavares Sabino (1981, p.149)

RESUMO

As micoses superficiais e cutâneas são infecções fúngicas que acometem a camada mais externa do estrato córneo da pele e seus anexos. São as micoses mais frequentes dentre todas as infecções fúngicas e estão distribuídas por todo o mundo, afetando todas as faixas etárias. O impacto primário destas micoses é seu aspecto visual com estética negativa. Contudo, não se restringem apenas ao aspecto estético, vindo a ser um grave problema de saúde na população neonatal, senescente e de imunocomprometidos. Além disso, muitos fármacos exibem toxicidade alta, interações medicamentosas e alto custo econômico. As recidivas por meio do tratamento convencional costumam ser frequentes, as quais podem ser ocasionadas por cepas resistentes. Esse cenário torna premente a busca por antifúngicos inovadores. No presente estudo avaliou-se atividade antifúngica de 19 curcuminoides, provenientes da composteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ), contra fungos filamentosos dermatofíticos dos gêneros *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* e leveduriformes (*Candida* spp.), de cepas de referência ATCC e de isolados clínicos, provenientes da coleção do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP), bem como avaliou-se toxicidade dos curcuminoides mais potentes contra células de queratinócitos humanos (HaCat) e larva *G. mellonella*. Afim de verificar a atividade antifúngica dos compostos, foram determinados os valores: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM); ensaio de atividade combinatória dos curcuminoides e fluconazol, para *Candida tropicalis* e terbinafina, para as espécies de dermatófitos e ensaios de inibição de desenvolvimento hifal. Seis curcuminoides apresentaram inibição maior que 50% em mais de uma cepa dentre as testadas. Os valores de CIM variaram de 1,9 a 31,2 µg/mL. O curcuminoide 2 (DMC), foi o composto mais promissor da série, apresentou atividade antifúngica contra linhagens de cepa de origem clínica de *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *E. floccosum* e cepas referência de *T. rubrum* CBS 118892 e *C. tropicalis* ATCC 13803; efeito sinérgico em combinação com a terbinafina contra *E. floccosum* e efeito inibitório do desenvolvimento de hifal da *C. tropicalis*. DMC apresentou baixa toxicidade contra células HaCat nas concentração do CIM e não apresentou toxicidade na concentração de 125 µg/mL (3 ×CIM) contra *G. mellonella*, o que o torna um composto promissor para abordagens terapêuticas no controle de dermatomicoses.

Palavras-chave: Curcumina, Curcuminoides, Atividade Antifúngica, Micoses, Dermatófitos, *Candida* sp.

ABSTRACT

Superficial and cutaneous mycoses are fungal infections that affect the outermost layer of the stratum corneum of the skin and its attachments. They are the most frequent mycoses among all fungal infections and are distributed all over the world. The first impact of these mycoses is their visual appearance with a negative aesthetic. However, they are not restricted to the aesthetic aspect, becoming a serious health problem in the neonatal, senescent and immunocompromised population. In addition, many drugs exhibit high toxicity, drug interactions and high economic cost. Relapses through conventional treatment are often frequent, which can be caused by resistant strains. This scenario demands the development of potent but safer compounds. Herein, we described the antifungal activity of a novel curcuminoid against dermatophyte and *Candida* species. A series of nineteen curcuminoid analogs was submitted to antifungal assay to assess MIC (minimum inhibitory concentration) and MFC (minimum fungicidal concentration) determined by the broth microdilution method. First, all compound were tested at 31.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ in order to select the most active compound. The compound 3, 3'-Dimethoxycurcumin (DMC) showed the highest growth-inhibitory activity the largest spectrum of action against dermatophyte clinical isolates and reference strains of *Candida tropicalis* ATCC and *Trichophyton rubrum* CBS, with MIC values range of 1.9–31.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$. DMC exhibited fungistatic activity. Inverted microscope indicated *C. tropicalis* hyphal growth was completely inhibited by DMC. We also found that DMC demonstrated low toxicity against human keratinocyte cells and has no toxicity against *Galleria mellonella* larvae. DMC antifungal activities against *Candida* spp. and dermatophytes, and antibiofilm formation activity against *C. tropicalis*. In addition, DMC was selective to fungal cells compared to human keratinocytes cells.

Keywords: Curcumin, Curcuminoids, Antifungal Activity, Mycoses, Dermatophytes, *Candida* sp.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
2.1. Epidemiologia e etiologia das infecções fúngicas	13
2.2. Diagnóstico das dermatomicoses	15
2.2.1. Exame de microscopia direta	15
2.2.2. Cultura e sensibilidade a antifúngicos	15
2.2.3. Identificação: aspectos Biológicos dos agentes causadores das Dermatomicoses	16
2.3. Manifestações clínicas das dermatomicoses	17
2.4. Tratamento	18
2.5. Mecanismos de Resistência	19
2.6. Mecanismo de Patogenicidade: Biofilme em espécies de <i>Candida</i>	20
2.7. Curcumina e seus Análogos (Curcuminoides)	21
3. OBJETIVOS	24
4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	25
4.1. Banco de Curcuminoides	25
4.2. Microrganismos	26
4.3. Testes de Suscetibilidade	26
4.4. Atividade Antifúngica da Combinação de Curcuminoides Seleccionados e Fármacos Antifúngicos	28
4.5. Inibição do Crescimento Hifal de <i>Candida</i>	29
4.6. Ensaios de Toxicidade	30
 CAPÍTULO 2 - Artigo	 32
5. Antifungal activity of Curcumin Analogs against Dematophytes and <i>Candida</i> species	32
ABSTRACT	34
INTRODUCTION	35
MATERIALS AND METHODS	37
Chemical Procedures	37
Microorganisms and Culture	37
Antifungal susceptibility assays	38
Checkerboard assay	39
Hyphal <i>Candida</i> growth inhibition assay	39
Citotoxicity assay	40
Toxicity test in <i>Galleria mellonella</i>	40

RESULTS	41
Susceptibility testing of curcuminoids against <i>Candida</i> and dermatophytes	41
Checkerboard assay	41
DMC inhibits <i>C. tropicalis</i> hyphal growth.....	42
Toxicity against keratinocytes assay	42
Toxicity against <i>Galleria mellonella</i> assay	42
DISCUSSION	42
REFERENCES	47

CAPÍTULO 3	57
6. CONCLUSÃO	58
7. PERSPECTIVAS FUTURAS	58
8. DISSEMINAÇÃO & AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS	58
REFERÊNCIAS	59

1. INTRODUÇÃO

Dentre todas as micoses, as superficiais e cutâneas são as mais frequentes, afetando uma grande parcela da população mundial. As taxas de ocorrência são ainda maiores em países de áreas tropicais, como no Brasil, visto que o clima quente e úmido são fatores predisponentes para as infecções fúngicas (MEZZARI et al, 2017; ROCHA et al. 2018).

O principal agente etiológico das dermatomicoses é o grupo dos fungos dermatófitos. Este grupo é dividido em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*, e sua principal característica é que todos os gêneros são constituídos por fungos filamentosos queratinofílicos e queratinolíticos, ou seja, possuem alta afinidade com tecidos queratinizados e utilizam a queratina da pele, cabelos e unhas como fonte de aminoácidos, ocasionando danos aos tecidos acometidos (MEZZARI et al, 2017).

As leveduras, especialmente o gênero *Candida*, também desempenham um papel relevante no desenvolvimento de infecções cutâneas. Algumas espécies de *Candida* fazem parte da microbiota humana, porém, quando há desequilíbrio entre o patógeno e o hospedeiro, atuam como oportunistas causando graves infecções (SOUZA et al., 2007).

Um dos fatores de virulência mais importantes das espécies de *Candida* é a sua capacidade alterar a forma de suas células, de planctônica para filamentosa (hifas ou pseudo-hifas), destruindo o tecido infectado (CORREIA et al. 2015). Essa capacidade de alterar a morfologia celular, é crucial para a formação do biofilme, que é considerado um importante mecanismo de patogenicidade (SARDI et al. 2013).

Em geral, a *Candida albicans* é a espécie mais proeminente, sendo o foco da maioria das pesquisas. No entanto, espécies não-*albicans* emergiram neste campo como agentes etiológicos, como *C. parapsislosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (FICH et al., 2014).

O grande impacto na qualidade de vida dos pacientes causada por dermatomicoses afeta diretamente quatro relevantes áreas: física, ocupacional, fisiológica e psicossocial. Em casos de onicomicose, há alterações nas unhas, diminuição do tato, dor, dificuldade de locomoção, além da limitação nas atividades esportivas (LLADÓ et al., 2016).

Além das sequelas físicas descritas, as micoses superficiais da pele têm grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, relacionadas a fatores emocionais e psicológicos, causando constrangimento, perda de confiança, baixa autoestima, ansiedade e depressão (NARANG et al., 2019).

No tratamento das dermatomicoses, os principais antifúngicos utilizados são: azóis, polienos e alilaminas. O mecanismo de ação da maioria dos fármacos atua principalmente no

genoma fúngico, em componentes da parede ou membrana celular. Outra limitação apresentada por esses fármacos é a sua alta toxicidade, o que faz com que seja um alto risco para pacientes imunossuprimidos, além de seus efeitos adversos severos (VLAHOVIC, 2016; FUENTEFRÍ et al., 2018).

Tendo em vista o alto custo dos medicamentos antifúngicos, os graves efeitos adversos dos mesmos, principalmente para pacientes imunossuprimidos, e os problemas relacionados à resistência fúngica, são fatores que resultam na necessidade de inovação de agentes antifúngicos, especialmente de baixa toxicidade (WONG et al. 2014; PIERCE et al. 2015; VILA et al. 2017).

A *Curcuma longa* é uma planta da família Zingiberaceae. Essa planta acumula em seus rizomas, três principais curcuminoides: a curcumina, a desmetoxicurcumina e a *bis*-desmetoxicurcumina, sendo a curcumina o de maior quantidade dentre as 3 substâncias (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A cúrcuma vem sendo usada pela medicina tradicional chinesa e indiana desde os tempos antigos e atualmente tem sido foco de pesquisas terapêuticas. Contudo, a curcumina (seu princípio ativo) é um produto natural privilegiado, tendo em vista seu potencial terapêutico. A curcumina possui a capacidade de interagir com múltiplos alvos moleculares, demonstrando atividade comprovada contra inúmeras doenças, como câncer, Alzheimer e infecções, por bactérias, fungos, protozoários e nematóides (SUETH-SANTIAGO et al., 2015; CAVALERI JIA, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia e etiologia das infecções fúngicas

As infecções fúngicas, denominadas micoses, são infecções geralmente crônicas, devido ao crescimento lento dos fungos. Elas causam um amplo espectro de doenças em humanos que variam desde afecções da camada mais externa do estrato córneo cutâneo até órgãos vitais, podendo comprometer suas funções. As micoses podem ser classificadas de acordo com o local da infecção, via de contaminação e tipo de virulência. De acordo com o sítio da infecção, são divididas em: superficiais, cutâneas ou superficiais cutâneas; subcutâneas; sistêmicas e oportunistas, sendo esta última a responsável pelos casos clínicos mais graves (ARAÚJO, 2018).

Dentre todas as micoses, as micoses superficiais e cutâneas estão entre as mais frequentes. É estimado que cerca de 20 a 25% da população mundial possui algum tipo de

6. CONCLUSÃO

Os curcuminoides analisados da **série I** apresentaram relevantes atividades antifúngicas contra cepas referência e linhagens de origem clínica de dermatófitos e espécies de *Candida*. O curcuminóide **2 (DMC)** se mostrou promissor, com grande espectro de ação, atingindo diferentes espécies. O efeito antifúngico da combinação sinérgica dada pela combinação do curcuminóide com a terbinafina contra *Epidermophyton floccosum*, e seu efeito inibitório isolado, contra: células planctônicas, desenvolvimento de hifas e biofilme maduro de *Candida tropicalis*, atrelado a baixa toxicidade em células de queratinócitos humanos e não toxicidade em *G. mellonella*, possibilitará o seu uso para novas abordagens terapêuticas no controle de dermatomicoses.

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados apresentados nesta tese são os primeiros passos de um estudo mais amplo que será realizado no projeto de doutorado. A partir da análise do potencial dos curcuminoides em estudo, estima-se realizar maior número de ensaios biológicos, envolvendo ensaios de biofilme, time-kill, entre outros, utilizando-se maior número amostral de cepas com o objetivo de comprovar o potencial do produto e, assim, almeja-se agregar o curcuminóide em um biomaterial anti microbiano.

8. DISSEMINAÇÃO & AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS

Os resultados alcançados pelo projeto terão seu potencial como objeto de patente avaliado juntamente à Agência Unesp de Inovação (AUIn), permitindo o registro de propriedade intelectual. Em caso positivo, os resultados estarão amplamente disponíveis e utilizáveis, seja de forma gratuita ou por meio da comercialização por licenciamento ao setor empresarial, ou mesmo para a criação de oportunidades empreendedoras de base tecnológica para esta comercialização.

Após as avaliações relativas à propriedade intelectual, os resultados serão disseminados na forma de publicações em periódicos de seletiva política editorial e anais de congressos, disponibilizando as conclusões à comunidade científica.

REFERÊNCIAS

- AHMED, M. M.; KHAN, M. A.; RAINSFORD, K. D. Synthesis of thiophene and NO-curcuminoids for antiinflammatory and anti-cancer activities. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 2, p. 1483-1501, 2013.
- ALMEIDA, L.M.M. et al. Resposta in vitro de fungos agentes de micoses cutâneas frente aos antifúngicos sistêmicos mais utilizados na dermatologia. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.84, n.3, p.249-55, 2009.
- APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 49, no. 3, pp. 163–169, 1993.
- ARAÚJO, C.A.C.; LEON, L.L. Atividades biológicas da *Curcuma longa* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.96, n.5, p.723-728, 2001.
- ARAÚJO, M. M.; ALENCAR, A. M. P. G. Pés de risco para o desenvolvimento de ulcerações e amputações em diabéticos. **Revista da Rede de Enfermagem do Nordeste**, Fortaleza, v. 10, n. 2, p.19-28, 2009.
- BARAN, R; KAOUKHOV, A. Topical antifungal drugs for the treatment of onychomycosis: an overview of current strategies for monotherapy and combination therapy. **Journal of The European Academy of Dermatology And Venereology**, v. 19, n. 1, p.21-29, 2005.
- BRANDA, S. S. et al. Biofilms: the matrix revisited. **Trends Microbiology**, v.13, p.20-26, 2005.
- BRASCH, Jochen; BECK-JENDROSCHEK, Vera; MAHN, Viktoria. Photochemical inhibition of *Trichophyton rubrum* by different compoundings of curcumin. **International Journal of Applied Ceramic Technology**, Kiel, Germany, p.1-17, 2018.
- CAMBUIM, I. I. F. N. et al. Avaliação clínica e micológica de onicomicose em pacientes brasileiros com HIV/AIDS. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Recife, v. 44, n. 1, p.40-42, 2011
- CAVALERI, F.; JIA, W. The True Nature of Curcumin's Polypharmacology. **Journal of Preventive Medicine**, v. 02, n. 02, p.1-11, 2017.
- CLSI. M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; approved standard— third edition. **Clinical and Laboratory Standard Institute**, v. 28, n. 14, p. 29, 2008a.
- CLSI. M38-A2 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard—Second Edition. **Clinical and Laboratory Standard**

Institute, v. 28, n. 16, p. 29, 2008b.

CORREIA, A. et al. *Candida albicans*: Clinical Relevance, Pathogenesis, and Host Immunity. **Human Emerging and Re-emerging Infections**, p.929-952, 2015.

COWEN, L. E. et al. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. **Cold Spring Harbor Perspectives In Medicine**, v. 5, n. 7, p.1-22, 10 nov. 2014. Cold Spring Harbor Laboratory.

DEORUKHKAR, S. C.; SAINI, S.; MATHEW, S. Non-*albicans Candida* Infection: An Emerging Threat. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p.1-7, 2014.

DIDEHDAR, M. et al. Characterization of clinically important dermatophytes in North of Iran using PCR-RFLP on ITS region. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 26, n. 4, p.345-350, 2016.

DONLAN, R. M., Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v.8, n.9, p.881-890, 2002.

DOVIGO, L. N. et al. Susceptibility of clinical isolates of *Candida* to photodynamic effects of curcumin. **Lasers in Surgery and Medicine**, vol. 43, no. 9, pp. 927–934, 2011.

ELY, J. W.; ROSENFELD, S.; STONE, M. S. Diagnosis and management of tinea infections. **American Family Physician**, v. 90, n. 10, 2014.

FERNANDES, L. de S. et al. Formulation, stability study, and pre-clinical evaluation of a vaginal cream containing curcumin in a rat model of vulvovaginal candidiasis. **Mycosis**, v. 61, n. 10, p.723-730, 2018.

FICH, F. et al. *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*: emerging pathogens in nail candidiasis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, n. 1, p. 24, 2014.

FUENTEFRIA, A.m. et al. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Letters in Applied Microbiology**, v. 66, n. 1, p.2-13, 11 dez. 2017.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B.. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, Cleveland, Ohio, v. 12, n. 4, p.501-517, out. 1999.

GUPTA, A. K. et al. Epidemiology and prevalence of onychomycosis in HIV-positive individuals. **International Journal of Dermatology**, Ontario, Canada, v. 39, p.746-753, 2000.

GUPTA, A. K.; DAIGLE, D. D.; CARVIEL, J. L. The role of biofilms in onychomycosis. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Ontario, v. 1, n. 1, p.1241-1246, 2016.

GUPTA, A. K.; FOLEY, K. A.; VERSTEEG, S. G. New antifungal agents and new formulations against dermatophytes. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1–2, 2017.

GUPTA, A. K.; PAQUET, M. Management of onychomycosis in Canada in 2014. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 19, n. 3, 2015.

- HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N. Why biofilms are important in nosocomial infections: the state of the art. **Arquivos de Medicina**, v.7, n. 1, p.27-26, 2013.
- HOLMES, A. R et al. Targeting efflux pumps to overcome antifungal drug resistance. **Future Medicinal Chemistry**: Future Science Ltd, v. 8, n. 12, p.1485-1501, 2016.
- JAWETZ, E.; MELNICK, J. L.; ADELBERG, E. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1980.
- KHAN, N. et al. “Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. **Fitoterapia**, vol. 83, no. 3, pp. 434–440, 2012.
- KOŁACZKOWSKA, A.; KOŁACZKOWSKI, M. Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans* *Candida* species. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 6, p. 1438–1450, 2016.
- KONNO, H. et al. Synthesis and evaluation of curcumin derivatives toward an inhibitor of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, New York**, v. 24, n. 2, p. 685-690, 2014.
- LAO, C. D et al. Dose escalation of a curcuminoid formulation. **Bmc Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 1, p.1-4, 17 mar. 2006.
- LLADÓ, D. C. et al. La onicomycosis y su influencia en la calidad de vida: Onychomycosis and its Influence on Quality of Life. **Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica**, Ciudad de México, v. 14, n. 4, p.318-327, 2016.
- LUSIANA; REICHL, S.; MÜLLER-GOYMANN, C. C. Infected nail plate model made of human hair keratin for evaluating the efficacy of different topical antifungal formulations against *Trichophyton rubrum* in vitro. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 3, 2013.
- MARTINS, C. V. B. et al. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p.337-339, 2008.
- MEZZARI, A. et al. Prevalência de Micoses Superficiais e Cutâneas em Pacientes Atendidos Numa Atividade de Extensão Universitária. **Revista Brasileira da Ciência da Saúde**, Porto Alegre, v. 21, n. 2, p.151-156, 2017.
- MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p.55-63, 1983.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 948, 2009.

- NARANG, T. et al. Quality of life and psychological morbidity in patients with superficial cutaneous dermatophytosis. **Mycoses**, 2019.
- NEELOFAR, K. Set al. Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. **Canadian Journal of Microbiology**, vol. 57, no. 3, p. 204–210, 2011.
- OLIVEIRA, J. C.s de. **Tópicos em Micologia Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Control-lab, p. 230., 2014.
- OSBORNE, C. S. et al. Amino Acid Substitution in *Trichophyton rubrum* Squalene Epoxidase Associated with Resistance to Terbinafine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Vienna, Austria, v. 19, n. 7, p.2840-2844, 2005.
- PABON, H. J. J. A synthesis of curcumin and related compounds. **Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas**, Leiden, v. 83, n. 4, p. 379-386, 1964.
- PETERS, B. M. et al. Polymicrobial Interactions: Impact on Pathogenesis and Human Disease. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 25, n. 1, p.193-213, 2012.
- PFALLER, M. A. Antifungal Drug Resistance: Mechanisms, Epidemiology, and Consequences for Treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p.3-13, 2012.
- PIERCE, C. G. et al. A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of resistance. **Npj Biofilms and Microbiomes**, [s.l.], v. 1, n. 1, p.1-8, 2015.
- PITANGUI, N. S. et al. Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. **Biofouling**. Abingdon: Taylor & Francis Ltd, v. 28, n. 7, p. 711-718, 2012.
- PLANGNAN, G.A.; PANDUKUR, S.G.;ITELIMA, J.U. Prevalence of Superficial Mycoses Affecting the Feet of Some Primary Schools Pupils in Jos MetropolisInt. J. **Innovative Biochem. & Microbio**, v. 5, n. 4, p.12-17, 2017.
- RENWICK, J. et al. Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to Infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. **Mycopathologia**, v. 161, n. 6, p. 377–384, 2006.
- RIZO, L. E. et al., “Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2),” **Genetics and Molecular Biology**, vol.36, no.1, pp. 105– 110, 2013.
- ROCHA, L.f. et al. Epidemiological profile of cutaneous superficial mycoses in South, Brazil. **Scientific Electronic Archives**, Rs, v. 11, n. 2, p.133-137, 2018.
- ROSEN, T. et al. Onychomycosis: epidemiology, diagnosis, and treatment in a changing landscape. **Journal of Drugs in Dermatology**: JDD, v. 14, n. 3, p. 223–33, 2015.

- SABINO, F. T. **O Encontro marcado** ed. 32^a, 33^a, 34^a. Rio de Janeiro: Record, 1981. 285p.
- SANER, M. V; KULKARNI, A. D.; PARDESHI, C. V. Insights into drug delivery across the nail plate barrier. **Journal of Drug Targeting**, v. 2330, n. 9, 2014.
- SARDI, J. C. O. et al. Antibacterial activity of diacetylcurcumin against *Staphylococcus aureus* results in decreased biofilm and cellular adhesion. **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 6, p.816-824, 2017.
- SARDI, J. C. O. et al. *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. **Journal of Medical Microbiology**, v. 62, n. 1, p.10-24, 2013.
- SCORZONI, L. et al. Antifungal Therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. **Front Microbiol.** v.8, p. 1–23, 2017.
- SHAHZAD, Muhammad et al. Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 3, p.269-273, 2014.
- SHARMA, M. et al. “Antifungal curcumin induces reactive oxygen species and triggers an early apoptosis but prevents hyphae development by targeting the global repressor TUP1 in *Candida albicans*. **Bioscience Reports**, [s.l.], vol. 30, no. 6, pp. 391–404, 2010a.
- SHARMA, M. et al. Synergistic anticandidal activity of pure polyphenol curcumin in combination with azoles and polyenes generates reactive oxygen species leading to apoptosis. **FEMS Yeast Research**, vol. 10, no. 5, pp. 570–578, 2010b.
- SHETTY, T. et al. Antifungal and Antioxidant Therapy for the Treatment of Fungal Infection with Microemulsion Gel Containing Curcumin and Vitamin C. **Asian Journal of Pharmaceutics**, Karnataka, India, v. 11, n. 4, p.717-725, 2017.
- SILVA, L. L.; OLIVEIRA, G. M. G.; NETO, M. J. Atividade fungicida de plantas do cerrado contra micoses superficiais e cutâneas. **Revista Saúde e Meio Ambiente – Resma**, Três Lagoas, v. 1, n. 6, p.1-16, 2018.
- SILVA, L.b. et al. Identification and antifungal susceptibility of fungi isolated from dermatomycoses. **Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology**, [s.l.], v. 28, n. 5, p.633-640, 2013.
- SINGAL, A.; KHANNA, D. Onychomycosis: diagnosis and management. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 77, n. 6, p. 659, 2011.

- SITTART, J. A. de S.; ZANARDI, F. H. T. Prevalência das dermatoses em pacientes da 4ª idade. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 6, n. 4, p.125-129, 2008.
- SOUZA, E. A. de F. et al. Frequência de onicomicoses por leveduras em Maringá, Paraná, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Maringá, v. 82, n. 2, p.151-156, 2007.
- SPITZER, M.; ROBBINS, N.; WRIGHT, G. D. Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. **Virulence**, v. 8, n. 2, p.169-185, 2016.
- SUETH-SANTIAGO, V. et al. Curcumin, The Golden Powder From Turmeric: Insights Into Chemical And Biological Activities. **Química Nova**, p.538-552, 2015.
- SUZUKI, S. et al. Discovery of Terbinafine Low Susceptibility *Trichophyton rubrum* strain in Japan. **Biocontrol Science**, Japao, v. 23, n. 3, p.151-154, 2018.
- THAKRE, A. D. et al. Effects of Cinnamaldehyde, Ocimene, Camphene, Curcumin and Farnesene on *Candida albicans*. **Advances in Microbiology**, v. 06, n. 09, p.627-643, 2016.
- TOLEDO, L. de et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 8, p.1-16, 2016.
- TOSTI, A.; ELEWSKI, B. E.. Onychomycosis: Practical Approaches to Minimize Relapse and Recurrence. **Skin Appendage Disorders**, v. 2, n. 1-2, p.83-87, 2016.
- VENKATESWARLU, S.; RAMACHANDRA, M. S.; SUBBARAJU, G. V. Synthesis and biological evaluation of polyhydroxycurcuminoids. **Bioorganic & Medicinal Chemistry, Oxford**, v. 13, n. 23, p. 6374-6380, 2005.
- VILA, T. et al. Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. **Virulence**, v. 8, n. 2, p.150-158, 2016.
- VLAHOVIC, T. C. Onychomycosis: evaluation, treatment options, managing recurrence, and patient outcomes. **Clinics in Podiatric Medicine and Surgery**, v. 33, n. 3, p. 305-18, 2016.
- WONG, S. S. W. et al. In Vitro and In Vivo Activity of a Novel Antifungal Small Molecule against *Candida* Infections. **Plos One**, v. 9, n. 1, p.1-17, 2014.