



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Câmpus de São José do Rio Preto

Veridianna Camilo Pattini

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

São José do Rio Preto
2020

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.

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

Comissão Examinadora

Prof. Dr. Luis Octávio Regasini
UNESP - Câmpus de São José do Rio Preto Orientador

Profa. Dra. Cátia Rezende
UNIFEV - Votuporanga

Profa. Dra. Marcia Maria da Costa Nunes Soares
Instituto Adolfo Lutz – São José do Rio Preto

São José do Rio Preto
27 de Março de 2020

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 grandes 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 existencia 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 a 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; CAVALERIIA, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Epidemiologia e etiologia das infecções fúngicas

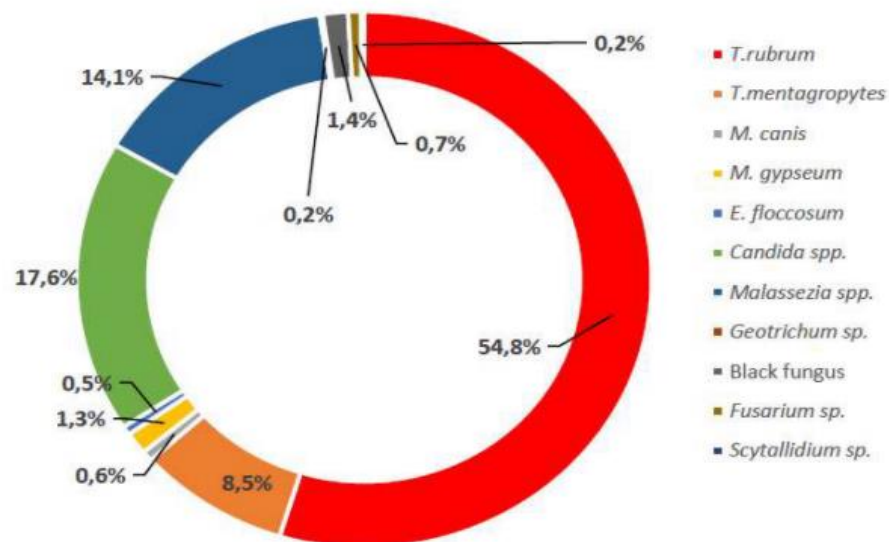
As infecções fúngicas, denominadas micoses, são infecções geralmente crônicas, devido ao crescimento lento dos fungos. Elas causam um amplo espectro de doenças em humanos que variam desde afecções da camada mais externa do estrato córneo cutâneo até órgãos vitais, podendo comprometer suas funções. As 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

dermatomicose e a frequência destas infecções aumentam principalmente em países de regiões de clima tropical, como no Brasil, devido ao clima quente e úmido, que são fatores de predisposição para infecções fúngicas (MEZZARI et al, 2017; ROCHA et al., 2018).

As micoses superficiais raramente são sintomáticas, pois limitam-se ao extrato córneo e cutícula. Por não induzirem respostas inflamatórias em seu hospedeiro, a infecção pode se agravar, resultando em uma infecção crônica. As micoses cutâneas, por outro lado, além de afetarem as camadas mais externas, também infectam os seus anexos, como cabelos e unhas e podem atingir camadas mais profundas da epiderme (VEASEY et al., 2017; SILVA; OLIVEIRA; NETO, 2018). Estas infecções podem ser causadas por diferentes grupos fúngicos, sendo os fungos dermatófitos os principais agentes etiológicos, seguido por espécies do gênero *Candida* (ALMEIDA et al., 2009; DIDEHDAR et al., 2016) (Figura 1).

Figura 1- Principais agentes causadores das micoses superficiais cutâneas.



Fonte: (ROCHA et al., 2018).

O grupo dos dermatófitos é dividido em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. A principal característica do grupo é que todos os gêneros do grupo são constituídos por fungos filamentosos queratinofílicos e queratinolíticos, ou seja, eles apresentam elevada afinidade com tecidos queratinizados e utilizam a queratina da pele, pelos e unhas como fonte de aminoácidos, provocando lesões. Os principais agentes etiológicos envolvidos nas infecções cutâneas são os dermatófitos do gênero *Trichophyton*, principalmente as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* (MEZZARI et al, 2017).

As leveduras também possuem um papel relevante no desenvolvimento de infecções cutâneas, especialmente leveduras do gênero *Candida* (Figura 1). As cândidas fazem parte da

microbiota humana, entretanto quando há desequilíbrio entre patógeno e hospedeiro, podem provocar graves infecções. Diante este cenário, espécies de *Candida* vêm sendo consideradas como patógenos primários em onicólise de unhas das mãos (SOUZA et al., 2007). De modo geral, *C. albicans* é a espécie que mais se destaca, sendo o foco da maioria das pesquisas. Porém, outras espécies de não-*albicans* têm surgido como agentes etiológicos emergentes, incluindo: *C. parapsislosis*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (ABARZÚA-ARAYA et al., 2014).

2.2. Diagnóstico das dermatomicoses

O diagnóstico consiste em exame clínico e laboratorial. No exame clínico, são realizadas as primeiras observações da lesões, como alterações na estrutura de pele, cabelos e unhas. No exame laboratorial, são conduzidas as análises do material coletado para verificar a presença fúngica e identificação das espécies. As análises laboratoriais são realizadas por meio da microscopia direta, cultura e teste de sensibilidade a antifúngicos, nos quais a identificação das espécies é conduzida (SINGAL; KHANNA, 2011).

2.2.1. Exame de microscopia direta

O método mais utilizado para o exame de microscopia direta é o tratamento do material coletado (fragmentos de unhas, pele, cabelos) com 10–20% de hidróxido de potássio (KOH) observado por meio do microscópio óptico. Por meio do exame de microscopia direta, é possível verificar a evidência fúngica nas amostras, pois o contato da amostra com a solução de KOH permite que fragmentos celulares sejam dissolvidos, facilitando a visualização das estruturas fúngicas, tais como: hifas ou fragmentos de hifas e células leveduriformes. O método é rápido e de baixo custo, porém não permite a identificação taxonômica do agente etiológico, se fazendo necessário a cultura da amostra para o diagnóstico mais eficaz (GUPTA; PAQUET, 2015).

2.2.2. Cultura

Outra parte do material coletado é cultivado em meio cultura. Cada amostra é inoculada em diferentes meios de cultura para que aja o crescimento e o isolamento prévio das colônias fúngicas.

O Ágar Sabouraud Dextrose (ASD, 4% peptona, 1% glucose, ágar e água) é o meio mais comumente utilizado para o isolamento da maioria dos fungos patogênicos. Ele permite o isolamento e a identificação morfológica da colônia de dermatófitos. Após o desenvolvimento

das colônias (7–14 dias), as culturas são direcionadas para identificação por características morfológicas, macroscópicas e microscópicas. O isolamento também pode ser realizado através do meio modificado para identificação de espécies dermatofíticas, o qual consiste no meio Ágar Sabouraud Dextrose modificado com indicador de pH (fenol vermelho). A degradação das proteínas presentes no meio pelos dermatófitos, resultam no excesso de íon amônio e o o meio alcalino faz com que a coloração do meio passe de amarelo para vermelho brilhante (ELY; ROSENFELD; STONE, 2014).

2.2.3. Identificação: Aspectos biológicos dos agentes causadores das Dermatomicoses

Para a identificação de um isolado clínico proveniente de dermatomicose, torna-se necessária a distinção entre fungos leveduriformes e filamentosos. A análise fenotípica fornece uma importante distinção inicial (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A. Dermatófitos

Os fungos filamentosos produzem hifas que formam colônias que variam em textura, cor e topografia. O grupo dos fungos filamentosos dermatófitos formam hifas e artrósporos nos tecidos queratinizados. Em cultura, a morfologia das colônias e estrutura de reprodução distinguem entre espécies.

No gênero *Trichophyton*, os micronídios são as formas predominantes de esporo. As espécies deste gênero diferenciam-se pela morfologia colonial, pela pigmentação e podem variar quanto a formação de conídios. A espécie *Thricophyton rubrum*, principal representante do gênero, apresenta microconídios em gotas pequenas implantadas em tirse e hifas septadas. Enquanto *T. mentagrophytes* apresenta microconídeos globosos e hifas em gavinha (OLIVEIRA, 2014).

No gênero *Microsporum*, os macronídios são as formas predominantes de esporos. Elas são largas, multicelulares, fusiformes ou naveta com paredes rugosas, formando-se nas extremidades das hifas. O gênero *Epidermophyton* apresenta macronídios claviformes ou em raquete e formam-se em colônias com tonalidade amarelo-esverdeada, que se transformam rapidamente produzindo um crescimento abundante de cor branca (OLIVEIRA, 2014)

Outra diferença entre *Microsporum* e *Epidermophyton* é que as espécies de *Microsporum* usualmente infectam a pele e os pelos, mas raramente as unhas, enquanto as

espécies de *Epidermophyton* invadem a pele e as unhas, mas não os cabelos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1980).

No gênero *Microsporum*, os macronídios são as formas predominantes de esporos. Elas são largas, multicelulares, fusiformes ou em navetas com paredes rugosas, formando-se nas extremidades das hifas. O gênero *Epidermophyton* apresenta macronídios claviformes ou em raquete e formam-se em colônias com tonalidade amarelo-esverdeada, que se transformam rapidamente produzindo um crescimento abundante de cor branca.

Outra diferença entre *Microsporum* e *Epidermophyton* é que as espécies de *Microsporum* usualmente infectam a pele e os pelos, mas raramente as unhas, enquanto as espécies de *Epidermophyton* invadem a pele e as unhas, mas não os cabelos (JAWETZ; MELNICK; ADELBERG, 1980).

B. *Candida* sp.

Os fungos leveduriformes apresentam colônias pastosas, sendo brilhantes ou opacas dependendo do gênero. Em amostras clínicas, o gênero *Candida* se apresenta sob a forma de leveduras ovais com 2–6 µm de diâmetro e podem apresentar hifas ou pseudo-hifas. Em cultura, sua morfologia é variável, com colônias geralmente pastosas, opacas e de coloração branca a castanha, podendo apresentar morfologia lisa ou rugosa. Algumas espécies possuem blastoconídios, pseudo-hifas, e/ou clamidoconídios terminais, como *C. albicans* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

2.3. Manifestações clínicas das dermatomicoses

As micoses superficiais e cutâneas se encontram entre as doenças mais incidentes no mundo, acometendo todas as faixas etárias (MEZZARI, 2017). Elas constituem a maior parte da procura por tratamentos nos consultórios dermatológicos e sua frequência se estende quando analisamos grupos menos privilegiados. Palangnan, Pandukur e Itelima (2017) analisaram a prevalência de micoses superficiais em crianças do ensino primário e puderam verificar a alta prevalência das infecções nas escolas localizadas em comunidade com baixo *status* econômico (17,3% das crianças) quando comparada à escola com maior *status* econômico (3,3%), o que caracteriza também um problema de desigualdade social associada a importância clínica das dermatomicoses.

Diferentemente das micoses subcutâneas e sistêmicas, o impacto mais evidente das micoses superficiais e cutâneas é o impacto visual na pele, unhas e cabelos. Porém, essas

condições não possuem apenas valores estéticos. Na população imunocomprometida, as lesões de onicomicoses expressam características mais intensas e o agente infectante pode causar infecções disseminadas e letais (CAMBUIM et al, 2011). Onicomicoses acometem cerca de 30% da população HIV-positiva, principalmente para os indivíduos com contagem de linfócitos TCD4 inferior a 400 células/mm³ (GUPTA et al, 2000). Se tratando de pacientes diabéticos, a infecção fúngica é facilitada e agravada, pois há o comprometimento epidérmico, propagando a infecção. Este é um grande risco para o desenvolvimento de ulcerações, podendo culminar na amputação de membros inferiores (BARAN; KAOUKHOV, 2005; ARAUJO; ALENCAR, 2009).

O alto impacto na qualidade de vida dos pacientes, prejudica diretamente a rotina dos portadores, podendo afetar quatro áreas relevantes: física, ocupacional, fisiológica e psicossocial. Nos casos de onicomicoses, há alterações nas unhas, diminuição das funções táteis (onicomicose nas mãos), dores nos pés que culminam em dificuldade de locomoção e impossibilitam o portador de ficar por um longo período em pé, além de limitar a prática de atividades esportivas (LLADÓ et al., 2016). Além das sequelas físicas descritas, as micoses superficiais cutâneas acarretam um grande impacto na qualidade de vida dos pacientes, com maiores consequências ligadas a fatores emocionais e psicológicos, ocasionando constrangimentos, perda de confiança, baixa auto-estima, ansiedade e depressão. Em estudos feitos por Narang e colaboradores (2019), foi mensurada a qualidade de vida e a morbidade psicológica em pacientes com dermatofitose por meio do questionário *General Health Questionnaire* (GHQ), sendo possível verificar que 84,9% dos pacientes demonstravam alto estresse psicológico devido a sua condição patológica.

2.4. Tratamento das dermatomicoses

O tratamento das dermatomicoses dependerá de diversos fatores, tais como: tipo da infecção, severidade e comprometimento da área afetada, o que pode resultar em um tratamento de uso tópico, sistêmico ou por meio de procedimento cirúrgico. Na maioria dos casos, a combinação de tratamentos tópicos e sistêmicos garantem maior sucesso na taxa de cura (LUSIANA; REICHL, MULLER-GOYMANN, 2013; TOSTI; ELEWSKI, 2016).

O tratamento tópico possui inúmeras vantagens, como: ação local, baixa toxicidade, baixa interação com outros fármacos e fácil adesão do paciente a terapêutica. Porém, a exposição da área contribuem para a constante remoção do produto e, nos tratamentos de onicomicose, há a dificuldade de penetração do fármaco na placa ungueal (SANER;

KULKARNI; PARDESHI, 2014; GUPTA; FOLEY; VERSTEEG, 2017). Por outro lado, o tratamento sistêmico, apesar de maior taxa de sucesso na terapêutica, seu uso prolongado pode acarretar efeitos adversos severos, incluindo danos hepatotóxicos e nefrotóxicos. Esses fatores contribuem para baixa adesão ao tratamento, reincidência da infecção e consequentemente, a seleção de organismos altamente resistentes (TOSTI; ELEWSKI, 2016).

Os principais fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento de dermatomicoses são: imidazóis (ex. cetoconazol), triazóis (ex. fluconazol e itraconazol), polienos (ex. anfotericina B e nistatina) e alilaminas (ex. terbinafina). Contudo, o arsenal terapêutico é escasso, pois a maioria dos fármacos exibem mecanismos de ação muito similares, atuando principalmente no genoma fúngico, especialmente em sequências de RNA; em componentes da parede celular e da membrana citoplasmática. No caso dos azóis, polienos e alilaminas, a função principal é a inibição da biosíntese de ergosterol, importante esteróide da membrana celular fúngica (VLAHOVIC, 2016; FUENTEFRI et al., 2018). Outra limitação apresentada pelos azóis e polienos é a toxicidade alta apresentada por esses fármacos, o que torna um risco elevado para pacientes imunosenescentes. A terbinafina apresenta contra indicações para pacientes hepatopatas e nefropatas, visto que não possui investigação acerca de sua segurança em pacientes idosos (SITTART; ZANRDI, 2008; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

As frequentes recidivas das infecções fúngicas durante o tratamento estão relacionadas à falta de adesão pelo paciente, por conta do alto custo econômico dos medicamentos, tempo de tratamento prolongado, uso irracional do fármaco, ineficácia, resistência fúngica e efeitos adversos severos (ALMEIDA et.al., 2009).

2.5. Mecanismos de Resistência Fúngica

Destacam-se entre os mecanismos de resistência: ativação de bombas de efluxo, modificação do alvo molecular por mutação, superprodução do alvo molecular, alteração na via de biosíntese de ergosterol e na composição química da parede celular (FUENTEFRI et al., 2018; ROSEN et al., 2015).

O mecanismo de resistência fúngica mais comumente encontrada é a expressão bombas de efluxo, descrito para espécies de *Candida* frente aos fármacos azólicos (HOMES et al., 2016). Há também outros mecanismos, incluindo: modificação do alvo molecular por mutação, o que impede a interação adequada com o fármaco, como a mutação do gene ERG11, descrito por Pfaller (2012) para espécies de *Candida*. O gene ERG11 codifica a lanosterol 14- α -desmetilase, enzima alvo dos azóis em leveduras. O mecanismo de resistência ocorre por

meio da mutação, resultando na redução da afinidade ou na incapacidade do fármaco em se ligar e impedir a ação catalítica da enzima.

Os mecanismos de resistência ligados a alteração de enzima alvo também foram descritos em fungos filamentosos, como para a resistência de azóis da espécie *Aspergillus fumigatus* por meio da modificação do gene CYP51A (ERG 11), gene responsável por codificar a lanosterol 14- α -desmetilase (COWEN et al., 2014) e para linhagens de *T. rubrum* resistente à terbinafina (OSBORNE et al., 2005; SUZUKI et al., 2018).

Contudo, há uma escassez de estudos acerca dos mecanismos de resistência fúngica. Grande parte das investigações são com espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*. Atualmente, perspectivas acerca dos mecanismos de resistência antifúngica envolvem estudos comparativos aos mecanismos de resistência aos agentes antibacterianos, uma vez que estes últimos são melhor detalhados (GHANNOUM; RICE, 1999; GHANNOUM, 2016).

2.6. Mecanismo de Patogenicidade: Biofilme em espécies de *Candida*

Os biofilmes são comunidades complexas sésseis em que células de vários microrganismos estão associadas uma a outra de maneira irreversível (não removida por meio de lavagem superficial). Estas comunidades podem ser formadas em diversos tipos de superfícies, tais como: tecidos vivos, dispositivos médicos, tubulações industriais, sistemas de água potável ou sistemas aquáticos naturais (DONLAN et al., 2002).

Esta associação entre células formada no biofilme é cercada por uma matriz polimérica extracelular, constituída principalmente por polissacarídeos, DNA, proteínas e células mortas (BRANDA et al., 2005). A produção de matriz extracelular pode impedir a penetração de agentes antimicrobianos, bem como pode produzir enzimas que degradam antibióticos. Adicionalmente, a alta densidade e diversidade celular desta associação celular favorece a transferência de genes de resistência e contribui para maior resistência dos microrganismos formadores de biofilmes aos antibióticos (PETERS et al., 2012; HENRIQUES et al., 2013).

Um dos mais importantes fatores de virulência de algumas espécies de *Candida* é a sua capacidade de alterar sua morfologia de células planctônicas leveduriformes para forma filamentosa, com a formação de hifas ou pseudo-hifas, destruindo o tecido infectado (CORREIA et al. 2015). Essa capacidade de alterar o estado morfológico das células é um passo crucial na formação do biofilme, que é considerado um importante mecanismo de patogenicidade (SARDI et al., 2013). Com a formação de biofilme, ocorre uma forte adesão ao tecido do hospedeiro e em outras superfícies, como em dispositivos médicos. Além da adesão

à superfícies, há também uma forte interação entre as células fúngicas, o que dificulta a penetração de fármacos (DEORUKHKAR; SAINI; MATHEW, 2014).

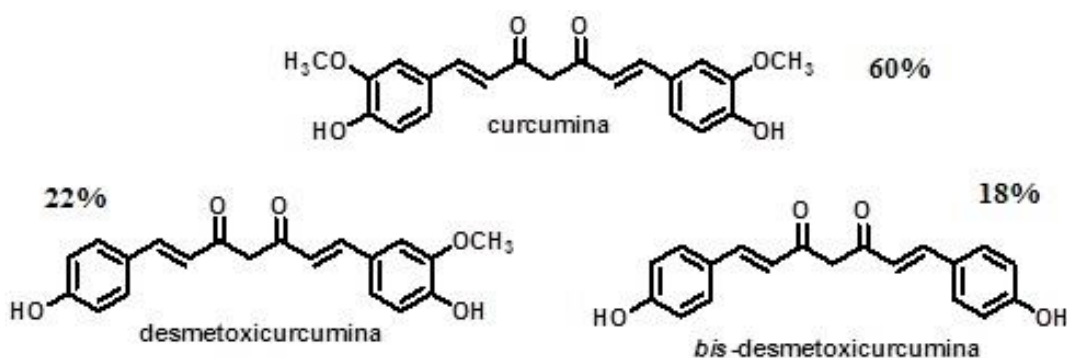
Candida albicans é conhecida pelo seus importantes mecanismos de virulência, porém as espécies não-*albicans* têm emergido significativamente como agentes etiológicos. Deorukhkar, Saini e Mathew (2014) pesquisaram sobre a emergência de espécies não-*albicans* e notaram uma alta formação de biofilme da espécie de *C. tropicalis* quando comparada à *C. albicans*.

Evidências indicam que baixa taxa de sucesso do tratamento em casos de dermatomicoses, especialmente onicomicoses, é em parte devido à formação de biofilme, o que sugere o desenvolvimento de fármacos antifúngicos que sejam capazes de penetrar e degradar biofilmes pré-formados e maduros (GUPTA; DAIGLE; CARVIEL, 2016).

2.7. Curcumina e seus Análogos (Curcuminoides)

Curcuma longa é uma planta da família Zingiberaceae, sendo popularmente conhecida como "curcuma" ou "açafrão-da-terra". Nos rizomas de *C. longa* são acumulados três metabólitos secundários majoritários: curcumina (60%), desmetoxicurcumina (22%) e bis-desmetoxicurcumina (18%) (Figura 2), os quais são responsáveis pela coloração amarela intensa, amplamente explorado com fins culinários (SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

Figura 2 - Metabólitos Secundários Majoritários dos Rizomas de *Curcuma longa* (Curcuminoides Naturais).



Fonte: adaptado de Sueth-Santiago et al. (2015).

Desde a antiguidade, a cúrcuma tem sido utilizada pela medicina tradicional chinesa e indiana. Atualmente, vem sendo foco de triagens clínicas. A curcumina tem sido considerada um produto natural privilegiado, tendo em vista seu potencial terapêutico e a sua capacidade de interagir com múltiplos alvos, bem como contra doenças complexas, como câncer e Alzheimer

(CAVALERI; JIA, 2017). Contudo, outras ações são descritas, como ação anti-inflamatória, antioxidante, antitumoral, anti-HIV e antimicrobiana (anti-protozoária, nematocida e antibacteriana) (ARAÚJO; LEON, 2001; SUETH-SANTIAGO et al., 2015).

A curcumina apresentou inibição *in vitro* de fungos filamentosos dermatófitos: *Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum*. Experimentos *in vivo*, utilizando *Cavia porcellus* (comumente chamado de "porquinho-da-índia") indicaram que a curcumina reduziu lesões cutâneas provocadas por *T. rubrum* e após sete dias observou-se o desaparecimento total das lesões (APISARIYAKUL; VANITTANAKOM; BUDDHASUKH, 1993).

Atualmente, a curcumina vem sendo investigada em conjunto com a terapia fotodinâmica contra fungos dermatófitos. Brasch, Beck-Jendroschek e Mahn (2018), obtiveram efeito inibitório alto contra isolados clínicos de *T. rubrum* com 2,5 e 5 mg L⁻¹ da curcumina quando exposta à luz LED de 420 nm.

Nos estudos de Neelofar e colaboradores (2011), a curcumina apresentou atividade antifúngica contra 14 cepas de *Candida* (*C. albicans* ATCC 10261, *C. albicans* ATCC 44829, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. glabrata* ATCC 90030 e 10 isolados clínicos) com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 250 a 2000 µg/mL. Em outro estudo envolvendo a atividade anti-*Candida*, a curcumina se mostrou ativa contra 38 diferentes cepas, com valores de CIM variando entre 250 a 650 µg/mL contra isolados sensíveis ao fluconazol e de 250 a 500 µg/mL contra isolados clínicos resistentes ao fluconazol (KHAN et al., 2012).

Além da atividade antifúngica contra células planctônicas, a curcumina exibiu efeito anti-adesão de espécies de *Candida* às células do epitélio bucal de pacientes HIV-positivos (MARTINS et al., 2008), atividade inibitória de crescimento hifal de *C. albicans* (SHARMA et al., 2010a), redução da atividade metabólica na formação de biofilmes das formas planctônicas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* (DOVIGO et al, 2011), bem como atividade inibitória contra diversos fatores envolvidos na formação e crescimento de biofilme, como: adesão inicial, crescimento, formação e expressão em isolados clínicos de *C. albicans* (SHAHZAD et al., 2014).

Thakre e colaboradores (2016) demonstraram o efeito inibitório da curcumina combinada com fluconazol contra biofilme pré-formado em 70% de *C. albicans* ATCC 10231, conhecida por sua intensa formação de biofilme. Por meio da combinação, o valor da CIM do fluconazol caiu em 16 vezes, de >128 µg/mL para 8 µg/mL, com concentração inibitória fracionada (ICIF) de 0,187, evidenciando uma atividade sinérgica.

Sharma e colaboradores (2010b) reportaram o efeito sinérgico da curcumina (em concentrações não-antifúngicas) combinada com fluconazol, miconazol, cetoconazol, itraconazol, voriconazol, nistatina e anfotericina B contra 21 isolados clínicos de *C. albicans*. A combinação da curcumina com os azóis e polienos resultou em uma redução de 10 a 35 vezes nos valores de CIM dos fármacos antifúngicos.

O mecanismo de ação antifúngica da curcumina está relacionado à biossíntese de ergosterol por meio da inibição da esterol- $\Delta^{5,6}$ -desaturase (ERG3). A redução na produção de ergosterol causa acumulação de seus precursores biossintéticos e morte fúngica via *burst* de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SHARMA et al., 2010a). Outros possíveis co-mecanismos de ação antifúngica da curcumina incluem a redução da secreção de proteinases e a alteração da atividade catalítica de ATPase (NEELOFAR et al., 2011).

A estabilidade e atividade antifúngica da curcumina em cremes dermatológicos também foi comprovada em ensaios *in vivo*. Fernandes e colaboradores (2018) demonstraram uma grande redução das lesões em ratos infectado por candidíase vulvovaginal. Em seis dias de estudo, o número dos animais infectados tratados com o creme vaginal contendo curcumina (1%) reduziram 83,4%. Shetty e colaboradores (2017), também investigaram a ação da curcumina. O efeito da curcumina foi investigado no tratamento de dermatomicoses, quando combinada com a vitamina C em microemulsão em gel. Para o ensaio, ratos foram infectados com *T. mentagrophytes* e tratados com a microemulsão. No décimo dia de tratamento, o grupo tratado não apresentou infecção, resultando em cultura negativa para o fungo, além disso a pele não apresentou secura, nem descamações. Adicionalmente, estudos clínicos demonstraram segurança e tolerabilidade da curcumina para seres humanos (LAO et al., 2006).

3. OBJETIVOS

Geral

Avaliar a atividade antifúngica e da toxicidade de curcuminoides da séries I, contra fungos filamentosos dermatofíticos (*Trichophyton* spp., *Epidermophyton* spp. e *Microsporum* spp) e leveduriformes (*Candida* spp.), de origem clínicas e cepas de referência (ATCC).

Específicos

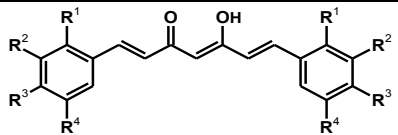
- a) Avaliação da atividade antifúngica dos curcuminoides da série I;
- b) Avaliação da atividade antifúngica promovida pela combinação de curcuminoides selecionados com fluconazol e terbinafina, utilizando metodologia *Checkerboard*;
- c) Avaliação da inibição do desenvolvimento hifal de *Candida* spp. causada por curcuminoides selecionados;
- d) Avaliação da citotoxicidade de curcuminoides selecionados, utilizando queratinócitos humanos (HaCaT);
- e) Avaliação da toxicidade aguda, utilizando *Galleria mellonella*, como organismo-modelo alternativo ao emprego de mamíferos.

4. PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

4.1. Banco de Curcuminoides

O banco de curcuminoides (Tabela 1) foi sintetizado, purificado e analisado por diversos pós-graduandos do Programa de Pós-Graduação em Química (IBILCE, Unesp São José do Rio Preto), sob orientação do Prof. Dr. Luis Octavio Regasini. As substâncias estão depositadas na compostoteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ), em temperaturas entre 15–18 °C. Análises de pureza, utilizando Cromatografia Líquida de Alta Resolução Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) foram realizadas antes dos ensaios biológicos. Foram disponibilizadas para os ensaios, as amostras com pureza igual ou superior a 95,0%.

Tabela 1 - Estrutura dos Curcuminoides da Compostoteca do Laboratório de Antibióticos e Quimioterápicos (LAQ).

				
SÉRIE I	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
1	OCH ₃	H	H	H
2	H	OCH ₃	H	H
3	H	H	OCH ₃	H
4	OCH ₃	OCH ₃	H	H
5	OCH ₃	H	OCH ₃	H
6	OCH ₃	H	H	OCH ₃
7	H	OCH ₃	OCH ₃	H
8	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
9	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
10	H	Ac	H	H
11	H	H	Ac	H
12	H	H	CH ₃	H
13	H	H	CF ₃	H
14	H	OH	H	H
15	H	H	OH	H
16	H	H	F	H
17	H	H	H	H
18	H	Cl	Cl	H
19	H	H	Cl	H

Fonte: O autor.

4.2. Microrganismos

Foram utilizadas cepas de referência e isolados clínicos provenientes de pacientes do Hospital de Base de São José do Rio Preto, São Paulo, Brasil. Todas as culturas estão depositadas na micoteca do Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Medicina de São José do Preto (FAMERP), São Paulo, Brasil. **Dermatófitos:** *Trichophyton rubrum* [CBS 118892 (CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center, Utrecht, The Netherlands) e isolados clínicos], e isolados clínicos das espécies *Trichophyton mentagrophytes*, *Microsporum canis* e *Epidermophyton floccosum*. **Leveduras:** *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida krusei* (ATCC 40147 e isolados clínicos), *Candida tropicalis* (ATCC 13803 e isolados clínicos) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019 e isolado clínico) (Tabela 02).

Tabela 2 - Isolados clínicos provenientes dos pacientes do Hospital de Base de São José do Rio Preto.

Siglas	Isolados clínicos	Origem da amostra
TR 1	<i>Trichophyton rubrum</i> 6195	Ungueal
TR 2	<i>Trichophyton rubrum</i> 6259	Ungueal
TM 1	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 6007	Pele
TM 2	<i>Trichophyton mentagrophytes</i> 6085	Ungueal
MC 1	<i>Microsporum canis</i> 6527	Pele
MC 2	<i>Microsporum canis</i> 6531	Pele
EF 1	<i>Epidermophyton floccosum</i> 6069	Ungueal
EF 2	<i>Epidermophyton floccosum</i> 6113	Ungueal
CP 1	<i>Candida parapsilosis</i> 6175	Ungueal
CP 2	<i>Candida parapsilosis</i> 6186	Ungueal
CK 1	<i>Candida krusei</i> 6473	Ungueal
CK 2	<i>Candida krusei</i> 6347	Ungueal
CT 1	<i>Candida tropicalis</i> 6477	Ungueal
CT 2	<i>Candida tropicalis</i> 6459	Plantar

Fonte: O autor.

4.3. Testes de Susceptibilidade

Os ensaios de susceptibilidade foram realizados como forma de avaliar a potência antifúngica do banco de curcuminoides (item 4.1, p. 16) por meio de valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), os quais foram expressos em µg/mL.

A determinação da CIM foi realizada por meio da técnica de diluição em microplaca de acordo com o protocolo descrito no documento M27-A3 (para leveduras) e M38-A2 (para fungos filamentosos), com pequenas modificações. Foi determinada a concentração inicial de corte de 31,2 µg/mL, como forma de seleção dos curcuminoides mais potentes, os quais prosseguiram para a determinação de CIM e CFM.

Para a determinação dos perfis de susceptibilidade das cepas, a porcentagem de inibição foi calculada por espectrofotometria, utilizando espectrofotômetro ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*), aplicando a seguinte equação:

$$I = 1 - \left(\frac{AbsT - AbsCT}{AbsCC} \right) \times 100$$

Na qual I = porcentagem inibitória; AbsT = absorbância do inóculo mais a solução da substância; AbsCT - absorbância do controle de esterilidade; AbsCC = absorbância do controle de crescimento.

A. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra Dermatófitos

Os dermatófitos foram cultivados em ágar batata dextrose (PDA) em placa e foram incubados a 36 °C por cinco dias. Após o período de incubação, as colônias foram cobertas com salina estéril (0,85%) e a superfície das colônias foi raspada com pipeta Pasteur. Em seguida, o inóculo foi ajustado para transmitância entre 68 a 70%, por análise em espectrofotômetro a 530 nm. A suspensão resultante foi diluída na proporção de 1:50 em meio RPMI 1640 e 100 µL da solução foi adicionada em cada poço da placa de microdiluição contendo 100 µL de RPMI 1640 e 100 µL da substância previamente preparada na concentração final de 31,25 µg/mL. As placas foram incubadas a 36 °C por cinco dias. Os ensaios foram realizados em triplicatas e em três experimentos independentes (SILVA et al., 2013 com alterações).

B. Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra Espécies de *Candida*

As espécies de *Candida* foram cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas em estufa à 30 °C. As colônias foram suspensas em salina estéril (0,85%) e a suspensão foi ajustada para transmitância entre 85 a 95% por análise em espectrofotômetro a 530 nm. Desta suspensão, 100 µL foram adicionados em cada poço da placa de microtitulação contendo 100 µL de RPMI 1640 e 100 µL da substância previamente preparada na

concentração final de 31,25 µg/mL, o que resultou em uma concentração fúngica final de 0,5 a $2,5 \times 10^6$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 30 ± 1 °C por 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicatas e em três experimentos independentes (SILVA et al., 2013 com alterações).

C. Determinação de Concentração Fungicida Mínima (CFM)

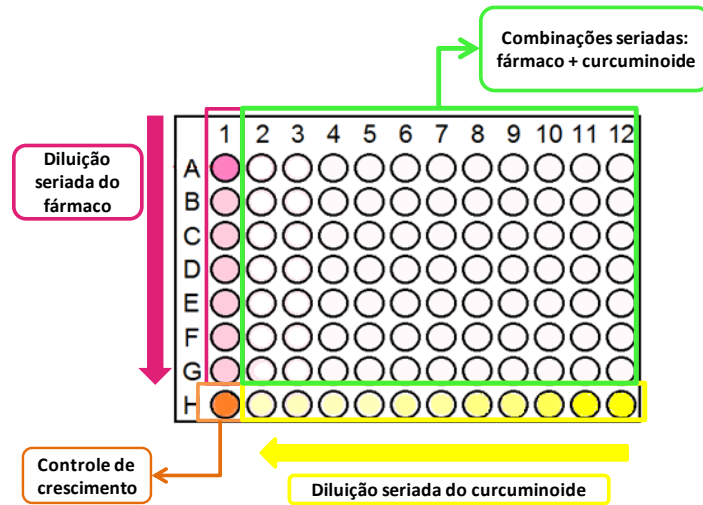
Para a determinação da CFM, uma alíquota de cada poço da placa de ensaio de determinação da CIM (itens 4.3A e 4.3B, p. 18 e 19) que apresentou atividade antifúngica foi inserida em uma placa de Petri contendo o meio Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) para leveduras e em Ágar Batata Dextrose (PDA) para fungos filamentosos. A CFM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu o desenvolvimento fúngico. Os ensaios foram realizados em triplicatas e em três experimentos independentes.

4.4. Atividade Antifúngica da Combinação de Curcuminoides Seleccionados e Fármacos Antifúngicos

Os três curcuminoides com as maiores porcentagens inibitórias e com os espectro de ação mais amplo contra dermatófitos e espécies de *Candida* foram seleccionados para avaliação de atividade antifúngica em combinação com fármacos, incluindo terbinafina e fluconazol contra dermatófitos e espécies de *Candida*, respectivamente. A porcentagem inibitória dos curcuminoides foi calculada por espectrofotômetro e por meio da fórmula: $I = 1 - (\text{AbsT} - \text{AbsCT} / \text{AbsCC}) \times 100$; na qual: I = porcentagem inibitória; AbsT = absorbância do inóculo mais a solução da substância; AbsCT= absorbância do controle de esterilidade; AbsCC absorbância do controle de crescimento

A avaliação foi realizada por método *Checkerboard* (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017), utilizando placa de microdiluição de 96 poços. Os curcuminoides seleccionados foram aplicados na vertical, em concentrações decrescentes, da direita para a esquerda, não sendo aplicado na última coluna (coluna 1). Na horizontal, foram aplicados os respectivos fármacos antifúngico em concentrações decrescentes, de cima para baixo, não sendo aplicado na última linha (linha H). De forma que a **coluna 1** apresentou somente a diluição seriada do fármaco e a **linha H** somente a diluição seriada do curuminoide, enquanto os demais poços da placa foram concentrações combinadas entre o curcuminoide e fármaco antifúngico (Figura 3, pag. 20).

Figura 3 - Esquema de montagem da placa de microdiluição para o ensaio *Checkerboard*.



Fonte: O autor.

Após o período de incubação, os resultados foram interpretados de acordo com a determinação da concentração inibitória fracionada (CIF) do curcuminoide e do fármaco, que é definida como a divisão da CIM do curcuminoide em combinação com o fármaco ($CIM^{CUR.MIX}$) pela CIM do mesmo isolado ($CIM^{CUR.ISO}$) e da divisão da CIM fármaco em combinação com o curcuminoide ($CIM^{FAR.MIX}$) pela CIM do mesmo isolado ($CIM^{FAR.ISO}$), respectivamente. Posteriormente, foi realizada a somatória da (Σ CIF) da CIF curcuminoide com a CIF do fármaco antifúngico.

$$\sum CIF = \frac{CIM^{CUR.MIX}}{CIM^{CUR.ISO}} + \frac{CIM^{FAR.MIX}}{CIM^{FAR.ISO}}$$

A combinação foi classificada segundo os valores de Σ CIF como: sinérgica (Σ CIF $\leq 0,5$), indiferente ($0,5 < \Sigma$ CIF ≤ 4) ou antagônica (Σ CIF > 4) (SPITZER; ROBBINS; WRIGHT, 2017).

4.5. Inibição do Crescimento Hifal de *Candida*

As cepas sensíveis aos curcuminoides foram incubadas a 30 °C por 24 h. Após o período de incubação, as colônias foram suspensas em salina estéril (0,85%) e a suspensão foi ajustada na escala 0,5 de McFarland, equivalente a 1×10^6 a 5×10^6 células por mL, e ajustadas nas concentrações de 1×10^5 , 1×10^4 e 1×10^3 nos meios RPMI 1640, YNB e caldo Sabouraud Dextrose por 3 e 4 horas a 37°C. A concentração e o meio mais favoráveis para o crescimento hifal foi selecionado para prosseguir com o teste com os curcuminoides. Os curcuminoides que

exibiram maior porcentagem de inibição (item 4.3B, p. 19) foram avaliados na concentração 31,25 µg/mL por 3 e 4 horas a 37 °C. A formação de hifas foi observada por meio do microscópio de luz invertida (TOLEDO et al., 2016 com alterações).

4.5. Ensaios de Toxicidade

A. Toxicidade contra Queratinócitos Humanos (HaCaT)

Para o ensaio de citotoxicidade dos curcuminoides selecionados foram utilizadas culturas de queratinócitos humanos (HaCat). Os ensaios foram realizados na Unidade de Biotecnologia da Universidade de Ribeirão Preto (UNAERP). As células foram cultivadas em meio RPMI (Sigma) suplementado com 10% de soro bovino fetal (FBS) a 37 °C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. A penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg / mL) foram adicionadas ao meio.

Após o cultivo, as células foram tripsinizadas (0,15% de tripsina e 0,02% de EDTA), contadas em hemocítômetro (2,5 x 10⁵ células / poços) e incubadas em microplaca de 96 poços durante o período de 24 h. Em seguida, preparou-se uma solução-mãe (10 mg/mL) dos curcuminoides selecionados em DMSO a 10% e diluiu-se cada agente diretamente em meio RPMI. Após a adição dos curcuminoides em meio fresco, as células foram cultivadas a 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂ por 24h. A citotoxicidade foi analisada através do ensaio com MTT (MOSMANN, 1983), conforme descrito por Rizo et al., (2013), com algumas modificações. Todos os tratamentos foram realizados em triplicado. O corante formazan foi extraído com 200 µL de isopropanol e quantificado espectrofotometricamente a 550 nm (BioTek ELx800, Cingapura). A absorbância de células não tratadas foi usada como referência.

B. Toxicidade Aguda contra *Galleria mellonella*

Os ensaios foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica e Laboratório de Expressão Gênica e Proteômica de Fungos Filamentosos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo de Ribeirão Preto (USP), pelo doutorando Mario Henrique Paziani, supervisionado pela Professora Doutora Marcia Regina von Zeska Kress.

A toxicidade de curcuminoides selecionados foi avaliada contra *Galleria mellonella*, como modelo alternativo a mamíferos segundo descrito por Renwick (2006) – adaptado, em *Galleria mellonella* (RENEWICK et al., 2006).

As larvas foram mantidas a 28 °C no escuro, em recipiente de vidro de 30 cm x 20 cm, até alcançarem o peso entre 200–250 mg. Após o completo desenvolvimento, foram privadas de alimentação e separadas em grupos de 10 indivíduos em placa de Petri de vidro para cada condição e diluição dos curcuminoides testados. Na hemolinfa de todas as larvas foram injetados 5 µL de cada curcuminóide selecionados a 125 µg mL⁻¹.

Após a administração das substâncias, as larvas foram mantidas a 28 °C, privadas de alimentação e iluminação direta. O mesmo foi realizado para os controles de DMSO e quaternário de amônio. Durante todo o período experimental, a cada 24 h as larvas foram retiradas da pré-pupa, a fim de retardar sua metamorfose. As larvas foram observadas no período de 5 dias e as larvas mortas foram contabilizadas, afim de analisar sua taxa de sobrevivência. A confecção dos gráficos e análises estatísticas por meio do método Log-rank (Mantel-Cox) foram realizadas no software GraphPadPrism 5.

Antifungal activity of Curcumin Analogs against Dematophytes and *Candida* species

Veridianna Camilo Pattini¹, Carlos Roberto Polaquini¹, Thiago Henrique Lemes¹, Natália Seron Brizzotti-Mazuchi², Mario Henrique Paziani³, Márcia Regina von Zeska Kress³, Mozart de Azevedo Marins⁴, Margarete Teresa Gottardo de Almeida², Luis Octavio Regasini^{1*}

¹São Paulo State University (Unesp), Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce), Campus São José do Rio Preto, Rua Cristóvão Colombo, 2265- Jardim Nazareth - São José do Rio Preto/SP - CEP 15054-000 Phone: +55 (17) 32212362

²São José do Rio Preto Medical School (Famerp), Brazil. Av. Brg. Faria Lima, 5416 - Vila Sao Pedro, São José do Rio Preto - SP, 15090-000, Phone: +55 (17) 3201-5843

³School of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP), Av. do Café - Vila Monte Alegre, Ribeirão Preto - SP, 14040-903, Phone: +55 (16) 3315-4181

⁴University of Ribeirão Preto (UNAERP), Avenida Costábile Romano 2201, Ribeirão Preto- SP, 14096-900, Phone: +55 (16) 3603.6728

Running head: Antifungal activity of curcuminoid

***Corresponding author:**

Luis Octavio Regasini, Ph.D.
Departamento de Química e Ciências Ambientais
Institute of Biosciences, Humanities and Exact Sciences (Ibilce)
São Paulo State University (Unesp),
Rua Cristóvão Colombo, 2265- Jardim Nazareth
CEP 15054-000 - São José do Rio Preto, SP, Brasil
Telephone: +55 (17) 32212200
Email: luisregasini@gmail.com

ABSTRACT

Aim

The high prevalence of superficial and cutaneous mycoses infections spread in worldwide. Furthermore, ineffective and toxic antifungal drugs demands the development of potent but safer compounds. Herein, we described the antifungal activity of a novel curcuminoid against dermatophyte and *Candida* species.

Methods and Results

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. 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 and reduced the viability of mature biofilms formed after 24 hours. 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.

Conclusions

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.

Significance and Impact of Study

In this study we described broad spectrum antifungal activity of curcumins analog, because of its *in vitro* antifungal activity against *Candida tropicalis* and dermatophytes species, anti-*Candida* hyphal development, moderate cytotoxicity towards cell line of immortalized human keratinocytes and non toxicity against the *in vivo* model *Galleria mellonella* larvae, the curcuminoid DMC may serve as a potential lead compound to develop a new antifungal agent.

Keywords: Curcumin, Curcuminoids, Antifungal activity, Mycoses, Dermatophytes, *Candida*.

INTRODUCTION

Superficial and cutaneous mycoses are the most frequent mycoses, affecting people around the world, mainly in tropical areas. The tropical climate is a zone of climate characterized by hot and humid conditions, which are predisposing factors for fungal infections (Mezzari et al, 2017; Rocha et al., 2018).

Dermatophyte fungi are the main etiological agent, being the most frequent group in the dermatomycoses. The group is divided into three genus: *Trichophyton*, *Microsporum* and *Epidermophyton*. These genus are constituted by keratinophilic and keratinolytic filamentous fungi, which use keratin as a source of aminoacids, causing tissue damage (Mezzari *et al.* 2017).

Candida species also play a relevant role in the development of cutaneous mycoses. These yeasts are comensals of human mycobiota, however when there is disturbance between pathogen and host cells, they can cause severe infections (Souza et al., 2007). One of the most important virulence factors of *Candida* species is its capacity to switch from planktonic yeast-form cells to a filamentous form (hyphae or pseudohyphae), destroying the infected tissues (Correia *et al.* 2015). This ability to change cellular morphology from the yeast to the hyphal form is a crucial step in the biofilm formation, which is considered an important pathogenicity mechanism (Sardi *et al.* 2013). In general, *Candida albicans* is the most relevant specie in superficial and cutaneous mycoses. However, *non-albicans* species have emerged as etiological agents, including *C. parapsislosis*, *C. tropicalis*, *C.krusei* and *C. glabrata* (Kończakowska and Kończakowski 2016; Fich *et al.* 2014).

Conventional antifungal drugs used to treat dermatomycoses includes: imidazoles, triazoles, polyenes and allylamines. However, the therapeutic arsenal is limited, due to the most drugs exhibit similar mechanism of action, including inhibition of ergosterol

biosynthesis; inhibition of complex proteins biosynthesis responsible for the cell wall and membrane structure; inhibition of Nucleic Acid, Proteins and Microtubule synthesis (Scorzoni *et al* 2017; Fuentefri *et al.* 2018).

The severe adverse effects, scarce arsenal therapeutic, high toxicity, high economic costs, long treatments, irrational drug use and the fungal resistance problems, generates an urgent need for the development of innovative antifungal agents, with novel mechanisms of action and low toxicity against hostcells (Wong *et al.* 2014; Pierce *et al.* 2015; Vila *et al.* 2017).

Curcuma longa is a medicinal plant, popularly named as turmeric. Their rhizomes are divided in major compounds: curcumin, demethoxycurcumin and *bis*-desmethoxycurcumin (Sueth-Santiago *et al.* 2015). Since ancient times, turmeric curcumin has been used by traditional Chinese and Indian medicine. In recent times, curcumin has been considered a privileged natural compound due to its therapeutic potential. Curcumin has the ability to interact with multiple targets, which proven efficiency against several complex diseases, such as cancer, Alzheimer's and infections, caused by bacteria, fungi, protozoa and helminths (Sueth-Santiago *et al.* 2015; Cavaleri and Jia 2017).

The current study investigated curcuminoids and its analogs as antifungal agents. First, we evaluated nineteen compounds against strains of dermatophytes (*Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Microsporum canis* and *Epidermophyton floccosum*) and *Candida* species (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* and *C. parapsilosis*). The most active compound (3,3'-dimethoxy curcumin) was selected and assessed for its antifungal ability to inhibit *C. tropicalis* hyphal development. Finally, the toxicity was evaluated against human keratinocyte cells and *Galleria mellonella* larvae.

MATERIALS AND METHODS

Chemical Procedures

Curcumin analogs were synthesized by Pabon protocol with minor modifications (Pabon, 1964; Venkateswarlu, Ramachandra & Subbaraju, 2005; Ahmed, Khan & Rainsford, 2013; Konno et al., 2014). Acetylacetone (5.0 mmol, 0.5 mL) was added to suspension of B_2O_3 (5.0 mmol) in DMF (2.0 mL) and stirred for 15 min at 60 °C. Tributyl borate (10 mmol) was added and stirred for 15 min at 60 °C. Respective benzaldehyde derivatives (10 mmol) was added and stirred for 5 min at 60 °C. Mixture of amylamine (0.1 mL) and acetic acid (0.3 mL) in DMF (1 mL) was added to the reaction and heated to 90 °C for 4 h. After cooling, aqueous solution of acetic acid (20%, 50 mL) was added and stirred for 1 h at 70 °C. Reaction medium was poured onto crushed ice from deionized water. Precipitated crude products were filtered, washed with cold water and dried at room temperature. Crude products were purified by gel filtration column chromatography (LH-20, Sephadex) using ethanol as mobile phase.

Microorganisms and Culture

The microorganisms used in this study were reference strains and clinical isolates of dermatophytes and *Candida* species. The reference strains were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and Fungal Biodiversity Center (CBS) as follows: *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 40147, *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 13803 and *Trichophyton rubrum* CBS 118892. The clinical isolates were obtained from the collection of the Laboratory of Microbiology, Department of Dermatological, Infectious and Parasitic Diseases, São José do Rio Preto Medical School (FAMERP), São José do Rio Preto, Brazil. Yeasts were grown on Sabouraud dextrose agar (Sigma-Aldrich®, SDA) and dermatophytes were grown on Potato Dextrose Agar (Sigma-Aldrich®, PDA) before each test.

Antifungal susceptibility assays

The susceptibility tests were performed, with minor modifications, using the broth microdilution methods according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008a, 2008b) guidelines M27-A3 (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts) and M38-A2 (Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-Forming Filamentous Fungi), for *Candida* spp. and dermatophytes, respectively. Briefly, Curcumin and curcuminoids **1–19** were diluted twofold in RPMI 1640 medium (Himedia) in 96-well microtiter plates. Each well containing 100 μ L of the compounds and RPMI medium was inoculated with 100 μ L of the fungal suspensions previously adjusted to a transmittance of 68 to 70%, for dermatophytes, and 85% to 95%, for *Candidas* to furnish a final inoculum of 0.4 to 5×10^4 and 0.5 to 2.5×10^6 colony-forming units (CFU) mL^{-1} for dermatophytes and *Candida* species, respectively.

In order to select the most active compound the curcuminoids were assayed at final concentration of $31.2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Growth and sterility controls were included for each assay and all tests were performed in triplicate in three independent experiments. The vehicle (DMSO) (Sigma- Aldrich) served as negative control and was used at the maximum final concentration of 10%. At this concentration, DMSO was not able to inhibit the fungal growth.

Fluconazole (Sigma-Aldrich®, FLU) and Terbinafine were used as standard antifungal drugs, in concentrations ranging from 0.125 to $64 \mu\text{g mL}^{-1}$ to *Candida* and dermatophyte species, respectively. The minimum inhibitory concentrations values (MICs) were measured by the samples absorbance using a spectrophotometer (Biospectro, SP22, Curitiba, Brazil), following incubation for 24 h at 30°C (*Candida* spp.) and for 10 days at 36°C until suitable conidiation (dermatophytes). MIC values were defined as the lowest concentration of compounds that inhibited in 50% the visible fungal growth in the microdilution wells.

After the MIC values determination, aliquots (100 μ L) from each well which did not demonstrated visible were subcultured on SDA plates and incubated at 30 °C for 24 h (*Candida* spp.) and at 36 °C for 5 days (dermatophytes). The minimum fungicidal concentration (MFC) was established as the lowest curcuminoid concentration that showed no growth, with approximately 99 to 99.5% killing activity.

Checkerboard assay

Checkerboard assay was used to evaluate synergism among **DMC** and fluconazole, as well as **DMC** and terbinafine against curcuminoid-sensitive strain, by microdilution checkerboard technique and a spectrophotometric method. Fluconazole and terbinafine solutions were diluted according to their MIC values. Curcuminoid **DMC** and the solutions drugs were added to the RPMI-1640 at serially two fold-diluted concentrations.

In order to classify the combination between **DMC** and drugs, the fractional inhibitory concentration index (FICI) was calculated as following equation:

$$FICI = (MIC \text{ fluconazole in combination} / MIC \text{ alone fluconazole}) + (MIC \text{ substance in combination} / MIC \text{ substance isolated}).$$
 Combinations were classified using FICI values suggested by Spitzer, Robbins and Wright (2017) FICI values ≤ 0.5 indicates synergy, $0.5 < FICI \leq 4$ indifference and $FICI > 4$ antagonism.

Hyphal *Candida* growth inhibition assay

Hyphal *Candida* growth inhibition assay was carried out as protocol described by Toledo and others (2016) with minor modifications.

Curcuminoid-sensitive strain *Candida tropicalis* was incubated at 30 °C for 24 h. After the incubation, colonies were suspended in sterile saline (0.85%) and the suspension adjusted to McFarland 0.5, equivalent to 1×10^6 to 5×10^6 cells per mL, and adjusted to 1×10^5 , 1×10^4 and 1×10^3 in RPMI 1640, YNB and Sabouraud Dextrose broth for 3 and 4 hours

at 37 °C. The most favorable concentration and medium for hyphal growth was selected for further testing with **DMC** at concentration 31.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for 3 and 4 hours at 37 °C. Hyphae formation was observed by inverted light microscope and counted.

Cytotoxicity assay

In order to test the cytotoxicity of **DMC**, the keratinocytes were cultured in RPMI medium at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂ until 90% confluence. Cells were trypsinized (0.15% trypsin and 0.02% EDTA), counted in a hemocytometer (2.5×10^5 cells/well), and incubated in a 96-well plate for 24 h. Stock solution (10 mg mL⁻¹) of **DMC** was prepared in 10% DMSO. After addition of the **DMC** in fresh medium, the cells were cultured at 37 °C in a 5% CO₂ atmosphere for 24 h and cytotoxicity was measured by the 3-[4,5-dimethylthiazole-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay (Mosmann 1983), as described by Rizo *et al.* (2013), with modifications. Briefly, 20 μL MTT/well (5 mg mL⁻¹ in Hanks solution) was added to the 96-well plate and incubated for 4 h under the same conditions. All treatments were carried out in triplicate. Formazan dye was extracted with 200 μL isopropanol and quantified spectrophotometrically at 550 nm (BioTek ELx800, Singapore). The absorbance of untreated cells was used as a reference.

Toxicity test in *Galleria mellonella*

In vivo toxicity was performed on *G. mellonella* larvae as model. Groups of 10 individuals (250 to 350 mg each larvae). For artificial inoculation in sixth-instar *G. mellonella* larvae was used Hamilton micro-syringe 7000.5 KH, the volume of 10 μL . For each larva, 5 μL of **DMC** was injected into the hemocoel through the last right proleg. As positive and negative controls, groups were inoculated with quaternary ammonium solution and DMSO, respectively. After the inoculation, the larvae were incubated at 28 °C, deprived of feed and direct illumination. Throughout the experimental period and every

12h, the larvae were removed from the pre-pupae, in order to delay their metamorphosis. Statistical analyses and graphics were performed by the Log-rank (Mantel-Cox) method in Prism 5 software (GraphPad®) (Renwick et al. 2006).

RESULTS

Susceptibility testing of curcuminoids against *Candida* and dermatophytes species

Among the nineteen curcuminoids tested (**1-19**) (Table 1), ten curcuminoids showed inhibitory percentage above 50% for dermatophytes. Four (**1**, **6**, **7** and **8**) inhibited only the standard *T. rubrum* CBS strain. The remaining six (**2**, **10**, **14**, **16** and **17**) had a larger spectrum of action inhibiting the growth of two or more strains (Table 2). For *Candida* species, only curcuminoid **2 (DMC)** was active and just for the reference strain *C. tropicalis* ATCC, inhibiting in 63% the growth, while for other species the inhibitory percentage was less than 40%.

DMC exhibited the most potent growth-inhibitory activity and the largest spectrum of action, being selected for the additional experiments. **DMC** inhibited the growth of five strains dermatophyte strains and *C. tropicalis* reference strain, with MIC₅₀ values ranging from 1.9 to 31.2 µg mL⁻¹. The lowest value MIC was 1.9 µg mL⁻¹ against *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* and *E. floccosum* clinical isolates.

Curcumin did not exhibit antifungal activity against any strains tested at 31.2 µg mL⁻¹.

MFC experiment indicated fungistatic ability of **DMC** against dermatophytes. Its MFC is >31.2 µg mL⁻¹ and MFC>125 µg mL⁻¹ against dermatophytes and *C. tropicalis*, respectively.

Checkerboard assay

FICI values of checkerboard assay suggested synergistic effects between terbinafine and **DMC** against *E. floccosum*. MIC values of terbinafine and **DMC**, when

individually tested, were $0.062 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $2.9 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. When the compounds were combined the MIC values of terbinafine and **DMC** decreased to $0.015 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively. The synergy of **DMC** was greater against *E. floccosum* clinical isolate (FICI of 0.26) when compared to the other strains (Table 3).

DMC inhibits *C. tropicalis* hyphal growth

Hyphal growth inhibition assay was performed with **DMC** against *C. tropicalis* ATCC 13803. High inhibition of the hyphae development (>90%) was observed on cells treated with the substance compared to untreated cells (Figure 1).

Toxicity against keratinocytes assay

DMC was also evaluated for its *in vitro* cytotoxicity against immortalized human keratinocytes cells (HaCaT), demonstrating IC_{50} value $21.7 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Selectivity index (SI) was calculated using IC_{50} value (HaCat cells) and MIC values (fungal strains). SI of **DMC** against *Candida* species was 0.7 and dermatophytes species ranged from 0.7 to 11.4 (Table 4).

Toxicity against *Galleria mellonella* assay

Toxicity activity assay was performed against *G. mellonella* larvae, exposed at $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($3 \times \text{MIC}$ value) of **DMC** and the individuals presented no toxicity with 100% of survival (Figure 3).

DISCUSSION

In this study, we synthesized a series of curcumin analogs. Among these compounds, **DMC** demonstrated effect against clinically relevant species, including *Candida tropicalis* ATCC 18103 and *T. rubrum* CBS 118892, as well as dermatophyte clinical isolates, with MIC values ranging from 1.9 to $31.2 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Antifungal activity of curcumin against dermatophyte and *Candida* species, has been reported by several authors. However, few studies demonstrated its activity against dermatophytes. Apisariyakul and co-authors (1995) reported the inhibition of dermatophytes growth through turmeric oil extracted from *Curcuma longa*. The MICs found were between 919.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 229.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *T. rubrum* and *T. mentagrophytes*, respectively, as well as 459.68 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against *Microsporum gypseum*. Although, curcumin was not active against any of the strains tested ($\text{MIC} > 10,000 \mu\text{g mL}^{-1}$). The study corroborates our results, since the curcumin showed no inhibitory activity (inhibition above 50%) against the strains at 31.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indicating less effectiveness than **DMC**.

Curcumin has been studied in conjunction with photodynamic therapy, which enhances its effect. Brasch, Beck-Jendroschek and Mahn (2018), obtained high inhibitory effect against clinical isolates of *T. rubrum* with 2.5 and 5 mg L^{-1} when the curcumin tested was exposed to the 420 nm LED light. Our results showed MIC values of 1.9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for dermatophyte reference strains and clinical isolates, including *T. rubrum*, which is lower than the activity of the curcumin exposed to the LED light. This indicates a great therapeutic potential of curcuminoid **DMC**.

Candida species were also reported in studies involving curcumin as antifungal agent. These studies showed several MIC values, including concentrations higher than those evaluated in our study, ranging from 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against planktonic cells of *C. albicans* (Alalwan *et al.* 2017; Shanzad *et.al.* 2014) and from 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ against planktonic cells of *C. tropicalis* (Neeofar *et al.* 2011). The divergences regarding curcumin MIC values, as well as the selective antifungal activity of **DMC** against some strains tested, may be due to several factors, such as different clinical isolates, purity of the tested compounds, biological characteristics of the species and antifungal methods (Lima *et al.* 2016).

The individual biological characteristics of each strain, even those that are the same species can justify the variable MIC values. The microorganisms are able to respond to the environment with physiological changes, such as mechanism of cellular defense or tolerance, generating several metabolites by multiple stimuli and complex signaling pathways (Albuquerque and Casadevall 2012). It is important to emphasize that the strains used in this research have different origins, being isolated from different patients and different infection sites.

It is known that fungal cells are eukaryotic as well as the human cells, therefore the most fungal pathogens share the same biochemical and biological processes with then host. Consequently, conventional antifungals also have high toxicity and severe adverse effects against the host (Roemer and Krysan 2014). Conventional antifungal drugs when combined with new antimicrobial compounds, with similar or different mechanisms of action, it is an alternative which may increase the drug efficacy, the antifungal spectrum and also decrease its toxicity, as well as the appearance of resistant microorganisms (Spitzer, Robbins and Wright 2017). Curcuminoid **DMC** when combined with terbinafine, presented MIC reduction against *E. floccosum* clinical isolate, indicating synergistic effect. This effect exhibited by **DMC** may allow new therapeutic approaches in the control of dermatomycosis.

The antifungal activity of **DMC** at the concentrations of the MIC value was evaluated and it was verified a fungistatic potential of the curcuminoid. Consequently, the MFC value was specified as higher than $31.2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Antifungals, which have fungistatic activity, as well as the curcuminoid under study, are widely used and in some cases are chosen rather than antifungals with fungicidal activity. In the treatment of some systemic mycoses, the use of amphotericin B has been replaced by triazoles, such as fluconazole and itraconazole, due to its side effects and toxicity (Malayeri, Rezaei, Raiesi 2018).

Candida species possess an arsenal of virulence factors and among the virulence

traits, the ability to form biofilm plays a central role in its pathogenicity, which results in high-level resistance to most antifungal agents. In majority of diseases, the greatest difficulty in the treatment is associated with the biofilm formation (Sardi *et al.* 2013). Therefore, the ability of antifungal agents to inhibit biofilm growth may represent a novel therapeutic strategy to combat *Candida* infections. In this context, **DMC** also had promising results as it shows inhibitory activity against biofilm formation of *C. tropicalis*. The microscopic analysis showed that *C. tropicalis* hyphal growth was completely inhibited in the presence of **DMC** at its MIC value. This result is consistent with the inhibitory effect of **DMC** on biofilm formation, since it is widely accepted that the switch between yeast and hyphal forms is a pivotal step in *Candida* biofilm formation (Sardi *et al.* 2013).

Hawser and Islam (1999) described fungicidal agents are more likely to act through the inhibition of *C. albicans* yeast to hyphal transition, while fungistatic agents block only the growth by budding. However, we proved that **DMC**, even if possess fungistatic activity, has the ability to block the *C. tropicalis* filamentation growth.

Although not investigated in the current study, this response may be due to product-induced gene modulation, as with curcumin. According Kumar *et al.* (2014), curcumin modulated 348 different genes of *C. albicans*. Among them, 51 genes were significantly upregulated and 297 genes downregulated. Some of these genes are involved with multiple essential biochemical and cellular pathways, including: cell cycle, cellular metabolic processes, DNA synthesis and repair, and yeast hyphal transition. Shahzad *et al.* (2014), also related the inhibitory activity of the curcumin against biofilm formation and development to the suppression of genes responsible for adhesion and hyphal formation. Sharma and co-authors (2010) have shown curcumin is responsible for regulating the TUP1 gene, an inhibitor of *C. albicans* hyphal formation.

The morphological transition of some *Candida* species from planktonic (yeast) state

to filamentous form and its ability to form biofilm is an important survival strategy, as they allow their adhesion, colonization and destruction of host tissues (Thakre *et al.* 2016). Therefore, the ability to change morphogenesis is considered a great strategy to prevent infectious invasions.

Potent antifungal activity, large spectrum of action and low toxicity are the properties that have been highlighted as essential for an ideal antifungal agent. The main difficulty described in the development of novel antifungal compound is associated with its toxicity (Liu *et al.* 2016).

Curcuminoid **DMC** exhibited low toxicity against normal human skin cells (IC_{50} 21.7 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and exhibited SI value ranging from 0.7 to 11.4 against *C. tropicalis* and dermatophytes. Indeed, the higher an SI value of compound, the safer it is. Compounds that exhibit SI values equal to or higher than 10 have been considered safe candidates for advance studies *in vivo* (Magalhães *et al.* 2013).

The toxicity of **DMC** was also performed against the alternative *in vivo* model *G. mellonella* larvae, due to its similarity to the innate immune system of mammals. In this assay, **DMC** showed no toxicity with 100% of larvae survival. *G. mellonella* larvae have been used to investigate virulence in several microorganisms in addition to the toxicity of new potential antimicrobial compounds (Binder, Maurer and Lass-Flörl 2016). The nontoxicity of the curcuminoid **DMC** will be possibility the use for the control of mycosis infections caused by dermatophytes and *Candida* species.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge financial support from the Grants: 2014/18330-0; 2018/15083-2 and 2018/08994-9, São Paulo Research Foundation (FAPESP); the Grants: 429322/2018-6; 471129/2013-5 and 306251/2016-7, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES code 001); the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Author Contributions

V.C.P. carried out the biological assays. T.H.L. helped with assays performed on dermatophytes. N.S.B.N. helped with assays performed on *Candida* species. C.R.P. and L.O.R. designed and synthesized the curcuminoids, M.H.P., M.R.v.Z.K. performed the *Galleria mellonella* toxicity assay. M.A.M. realized the cytotoxicity assay with HaCaT cells. V.C.P., M.T.G.A, L.O.R. analyzed the data. L.O.R. conceived and supervised the project. The manuscript was written by V.C.P supported by L.O.R. All authors have read and approved the final manuscript.

Conflict of interest:

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

- Ahmed, M. M., Khan, M. A. and Rainsford, K. D. (2013) Synthesis of thiophene and NO-curcuminoids for antiinflammatory and anti-cancer activities. *Molecules*, Basel, **18** (2), 1483-1501.
- Alalwan, H., Rajendran, R., Lappin, D.F., Combet, E., Shahzad, M., Robertson, D., Nile, C.J., Williams, C. and Ramage, G. (2017) The Anti-Adhesive Effect of Curcumin on *Candida albicans* Biofilms on Denture Materials. *Frontiers in Microbiology*, **8**, 659.
- Albuquerque, P. and Casadevall, A. (2012) Quorum sensing in fungi--a review. *Medical Mycology*, **50**, 337–45.
- Ali Malayeri, F., Rezaei, A. and Raiesi, O. (2018). Antifungal agents: Polyene, azole, antimetabolite, other and future agents. *Journal of Basic Research in Medical Sciences*, **5**, 48-55.
- Apisariyakul, A., Vanittanakom, N., Buddhasukh, D. (1993). Antifungal activity of turmeric oil extracted from *Curcuma longa* (Zingiberaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **49**, 163–169.
- Binder, U., Maurer, E., Lass-Flörl, C. (2016) *Galleria mellonella*: An invertebrate model to study pathogenicity in correctly defined fungal species. *Fungal Biology*, **120**, 288–290.

Brasch, J., Beck-Jendroschek, V., Mahn, V. (2018) Photochemical inhibition of *Trichophyton rubrum* by different compoundings of curcumin. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, **61**,393-399.

Cavaleri, F. and Jia, W. (2017) The true nature of curcumin's polypharmacology, *Journal of Preventive Medicine*, **2**, 1–11.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008a) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. M27–A3 and M27–S3. Wayne, PA: CLSI.

Clinical and Laboratory Standards Institute. (2008b) Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Conidium-forming Filamentous Fungi, M38–A2. Wayne,PA: CLSI.

Correia, A., Sampaio, P., Vilanova, M. and Pais, C. (2015) *Candida albicans*: clinical relevance, pathogenesis, and hostimmunity. In S. K. Singh (Ed.), Human emerging and re-emerging infections: viral and parasitic infections. Volume I. Chapter: 50, Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.

De Toledo, L., Ramos, M., Spósito, L., Castilho, E., Pavan, F., Lopes, É., Zocolo, G., Silva, F., Soares, T., dos Santos, A., Bauab, T. and De Almeida, M. (2016). Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *International Journal of Molecular Sciences* **17**, 1252, 1–16.

Fich, F., Abarzúa-Araya, A., Pérez, M., Nauhm, Y. and León, E. (2014). *Candida parapsilosis* and *Candida guilliermondii*: Emerging pathogens in nail candidiasis. *Indian Journal of Dermatology* **59**, 24–29.

Fuentefria, A., Pippi, B., Dalla Lana, D., Donato, K. and de Andrade, S. (2017). Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Letters in Applied Microbiology*, **66**, 2–13.

Hawser, S. and Islam, K. (1999) Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. *J Antimicrob Chemother* **43**, 411–413.

Kołaczkowska, A. and Kołaczkowski, M. (2016) Drug resistance mechanisms and their regulation in non-*albicans Candida* species. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **71**, 1438–1450.

Konno, H., Sato, T., Saito, Y., Sakamoto, I. and Akaji, K. (2014) Synthesis and evaluation of curcumin derivatives toward an inhibitor of beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, New York, **24** (2), 685-690.

Kumar, A., Dhamgaye, S., Maurya, I., Singh, A., Sharma, M. and Prasad, R. (2013). Curcumin Targets Cell Wall Integrity via Calcineurin-Mediated Signaling in *Candida albicans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**, 167–175.

LLADÓ, D. C., Arias, , L. F., Mendoza, I. A., Bonifaz, A. (2016). La onicomycosis y su influencia en la calidad de vida: Onychomycosis and its Influence on Quality of Life. *Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica* **14**, 318–327.

Magalhães, T.F.F., da Silva, C.M., de Fátima, A., da Silva, D.L., Modolo, L.V., Martins, C.V.B., Alves, R.B., Ruiz, A.L.T.G., Longato, G.B., de Carvalho, J.E. and Resende-Stoianoff, M.A. (2013) Hydroxyaldimines as potent in vitro anticryptococcal agentes. *Letters in Applied Microbiology* **57**, 137–143.

Mezzari, A., Hernandez, K., Fogaça, R. and Calil, L. (2017). Prevalence of Superficial and Cutaneous Mycoses in Patients Attending a University Extension Activity. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde* **21**, 151–156.

Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* **65**, 55–63.

Neelofar, K., Shreaz, S., Rimple, B., Muralidhar, S., Nikhat, M. and Khan, L. (2011). Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest. *Canadian Journal of Microbiology* **57**, 204–210.

Pabon, H. J. J. (1964) A synthesis of curcumin and related compounds. *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas, Leiden*, **83** (4), 379-386.

Pierce, C.G., Chaturvedi, A.K., Lazzell, A.L., Powell, A.T., Saville, S.P., McHardy, S.F. and Lopez-Ribot, J.L. (2015) A novel small molecule inhibitor of *Candida albicans* biofilm formation, filamentation and virulence with low potential for the development of

resistance. *NPJ Biofilms Microbiomes* **1**, 15012, 1–8.

Pitangui, N., Sardi, J., Silva, J., Benaducci, T., Moraes da Silva, R., Rodríguez-Arellanes, G., Taylor, M., Mendes-Giannini, M. and Fusco-Almeida, A. (2012). Adhesion of *Histoplasma capsulatum* to pneumocytes and biofilm formation on an abiotic surface. *Biofouling* **28**, 711–718.

Rizo, W., Ferreira, L., Colnaghi, V., Martins, J., Franchi, L., Takahashi, C., Beleboni, R., Marins, M., Pereira, P. and Fachin, A. (2013). Cytotoxicity and genotoxicity of coronaridine from *Tabernaemontana catharinensis* A.DC in a human laryngeal epithelial carcinoma cell line (Hep-2). *Genetics and Molecular Biology* **36**, 105–110.

Rocha, L.F., Bittencourt, F.M., Hernandes, K.M., Gonçalves, S.M.B, Rodrigues, C.M.G, Bergamo, V.Z., Calil, L.N., Mezzari, A. (2018). Epidemiological profile of cutaneous superficial mycoses in South, Brazil. *Scientific Electronic Archives*, **11**, 133–137.

Roemer, T. and Krysan, D.J. (2014) Antifungal drug development: challenges, unmet clinical needs, and new approaches. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. **4**, a019703.

Sardi, J.C., Scorzoni, L., Bernardi, T., Fusco-Almeida, A.M. and Mendes Giannini, M.J. (2013) *Candida* species: current epidemiology, pathogenicity, biofilm formation, natural antifungal products and new therapeutic options. *Journal of Medical Microbiology* **62**, 10–24.

Scorzoni, L., de Paula e Silva, A. C. A, Marcos, C. M., Assato, P. A., de Melo, W. C. M. A., de Oliveira, H. C., Costa-Orlandi, C. B., Mendes-Giannini, M. J. S. and Fusco-Almeida, A. M. (2017) Antifungal Therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Frontiers in Microbiology* **8**, 1–23.

Shahzad, M., Sherry, L., Rajendran, R., Edwards, C., Combet, E. and Ramage, G. (2014). Utilising polyphenols for the clinical management of *Candida albicans* biofilms. *International Journal of Antimicrobial Agents*, **44**, 269–273.

Sharma, M., Manoharlal, R., Puri, N. and Prasad, R. (2010). 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*, **30**, 391–404.

Spitzer, M., Robbins, N. and Wright G.D. (2017) Combinatorial strategies for combating invasive fungal infections. *Virulence* **8**, 169–185.

Sprengel-Lima, C., Polaquini, C. R., dos Santos, M. B., Gullo, F. P., Leite, F. S., L Scorzoni, L., Bolzani, V. S., Mendes-Giannini, M. J. S., Fusco-Almeida, A. M., Rezende, A. A. and Regasini, L. O. (2016) Anti-*Candida* and anti-*Cryptococcus* evaluation of 15 non-alkaloidal compounds from *Pterogyne nitens*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. **6**, 841–845.

Sueth-Santiago, V., Mendes-Silva, G., Decoté-Ricardo, D. and Lima, M. (2015). Curcumin, the Golden Powder from Turmeric: Insights into Chemical and Biological Activities. *Química Nova* **38**, 538–552.

Thakre, A., Mulange, S., Kodgire, S., Zore, G. and Karuppayil, S. (2016). Effects of Cinnamaldehyde, Ocimene, Camphene, Curcumin and Farnesene on *Candida albicans*. *Advances in Microbiology*, **06**, .627–643.

Venkateswarlu, S., Ramachandra, M. S., Subbaraju, G. V. (2005) Synthesis and biological evaluation of polyhydroxycurcuminoids. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **13** (23), 6374–6380.

Vila, T., Romo, J. A., Pierce, C. G., McHardy, S. F., Saville, S. P. and Lopez-Ribot, J. L. (2017) Targeting *Candida albicans* filamentation for antifungal drug development. *Virulence* **8**, 150152.

Wong, S.S., Kao, R.Y., Yuen, K.Y., Wang, Y., Yang, D., Samaranayake, L.P. and Seneviratne, C.J. (2014) *In vitro* and *in vivo* activity of a novel antifungal small molecule against *Candida* infections. *PLoS One* **9**, e85836.

Wu, S., Wang, Y., Liu, N., Dong, G. and Sheng, C. (2017) Tackling fungal resistance by biofilm inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* **60**, 2193–2211.

FIGURE LEGENDS

Figure 1 Curcuminoid **DMC** inhibits biofilm formation, by preventing hyphal development of *Candida tropicalis*. *C. tropicalis* ATCC 13803 hyphae development were formed on 96-well microtiter plates and observed on Inverted Binocular Microscope of 400x. The photographic image of 4 microscopic fields shows a control group of fungal cells with hyphae development after 4 hours (1–4) and cells treated with compound **DMC** (5–8) without hyphae formation.

Figure 2 Curcuminoid **DMC** shows non toxicity to the larvae *Galleria mellonella*. The larvae of *Galleria mellonella* was exposed to **DMC** by inoculation and the survival was monitored in 24 h intervals over a period of 7 days, represented by the survival percentage (%).

TABLE 1. Structures of curcumin and curcuminoids 1–19.

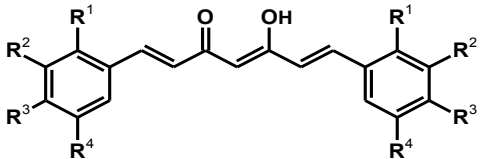
				
SÉRIE I	R ¹	R ²	R ³	R ⁴
Curcumin	H	OCH ₃	OH	H
1	OCH ₃	H	H	H
2	H	OCH ₃	H	H
3	H	H	OCH ₃	H
4	OCH ₃	OCH ₃	H	H
5	OCH ₃	H	OCH ₃	H
6	OCH ₃	H	H	OCH ₃
7	H	OCH ₃	OCH ₃	H
8	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃
9	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃
10	H	Ac	H	H
11	H	H	Ac	H
12	H	H	CH ₃	H
13	H	H	CF ₃	H
14	H	OH	H	H
15	H	H	OH	H
16	H	H	F	H
17	H	H	H	H
18	H	Cl	Cl	H
19	H	H	Cl	H

TABLE 2. Minimum inhibitory concentration (MIC) values of bioactive curcuminoids.

Compounds	TR CBS	TR 1	TR 2	TM 1	TM 2	MC 1	MC 2	EF 1	EF 2
	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM	CIM
curcumin	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2
2	3,9	1,9	>31.2	31,2	1,9	>31.2	>31.2	>31.2	2,9
10	31,2	>31.2	>31.2	>31.2	31,2	>31.2	>31.2	31,2	>31.2
14	>31.2	31,2	>31.2	>31.2	31,2	>31.2	31,2	>31.2	>31.2
16	31,2	31,2	>31.2	>31.2	>31,2	>31.2	>31.2	31,2	31,2
17	31,2	>31.2	31,25	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	31,2	31,2
18	31,2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	>31.2	31,2	31,2

MIC= Minimal Inibitory Concentration of the tested compounds;

Strains: **TR**= *Trichophyton rubrum* CBS 118892; **TR 1** and **TR 2**= *Trichophyton rubrum* clinical isolates; **TM 1** and **TM 2**=*Trichophyton mentagrophytes* clinical isolates; **MC 1** and **MC 2**=

Microsporum canis clinical isolates; **EF 1** and **EF 2**= *Epidermophyton floccosum* clinical isolates.

TABLE 3. Effect of combination between **DMC** and fluconazol or terbinafine against *Candida tropicalis* and dermatophyte species.

Strains	MICd (µg/mL)	MICc (µg/mL)	Checkerboard assay			
			Standard Drug + DMC			
			MIC (µg/mL)	Inibition (%)	FICI	Effect
CT	0,5	31,25	0,25 + 3,9	55%	0,62	Indifferent
TR CBS	0,25	3,9	0,125+0,97	52%	0,75	Indifferent
TR1	0,03	1,95	0,03+1,95	63%	1	Indifferent
TM1	0,031	1,95	0,015 + 0,24	54%	0,6	Indifferent
EF2	0,062	2,92	0,015 + 0,06	72%	0,26	Synergistic

Strains: **CT**= *Candida tropicalis* ; **TR**= *Trichophyton rubrum* ; **TM**=*Trichophyton mentagrophytes* ; **EF**= *Epidermophyton floccosum* ; **MICd**= Minimal Inibitory Concentration for antifungal drugs. Fluconazole and terbinafine for *Candida* and dermatophytes species, respectively; **MICc**= Minimal Inibitory Concentration **DMC**; **FICI**= fractional inhibitory concentration index.

TABLE 4. DMC Toxicity against cell line of immortalized human keratinocytes cells (HaCaT), fungal cells and selective index calculated by DMC MIC and IC₅₀ values.

Strains	Citotoxicity assay		
	MICc (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	SI
CT	31.2		0.7
TR CBS	3.9		5.5
TR1	1.9	21.7	11.4
TM1	31,2		0.7
TM2	1.9		11.4
EF2	2.9		7.4

MICc= Minimal Inibitory Concentration for Curcuminoid DMC; **IC₅₀**= Half maximal inhibitory concentration; **SI**= Selective index of the curcuminoid DMC to the strains tested; **Strains**: **CT**= *Candida tropicalis* ; **TR**= *Trichophyton rubrum* ; **TM**=*Trichophyton mentagrophytes* ;**EF**= *Epidermophyton floccosum*

FIGURE 1

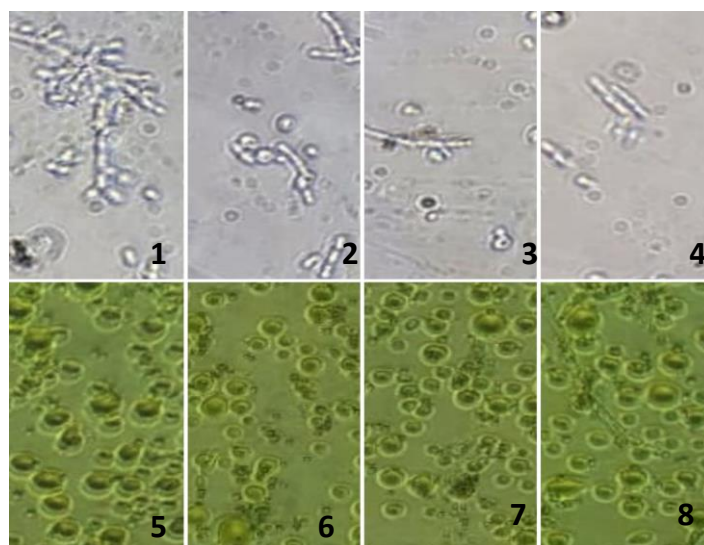
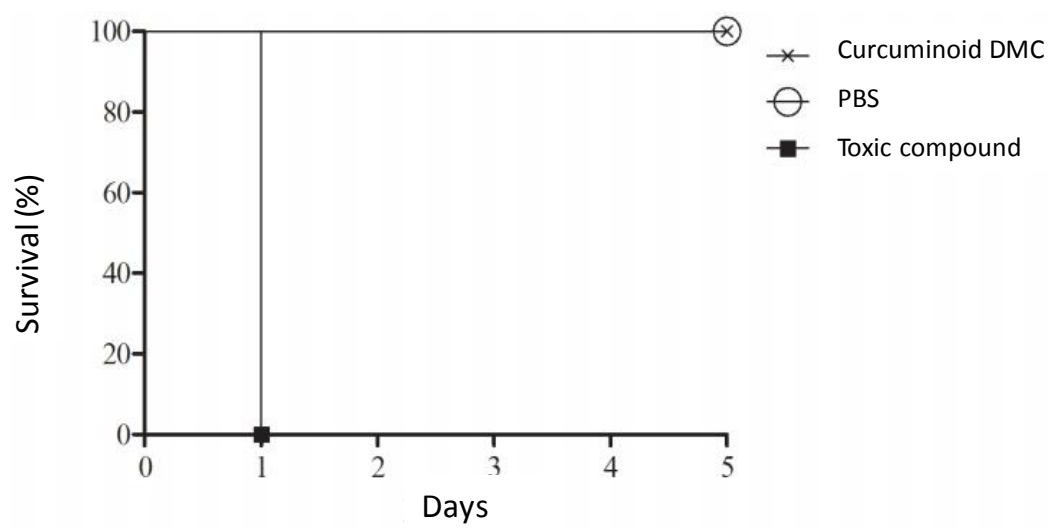


FIGURE 2



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 (AUI), 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.
- ARAUJO, 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.