

DANIEL BRUSTOLIN LUDWIG

**Estudo dos efeitos antifúngico e citotóxico da curcumina na presença
de antioxidantes.**

Guarapuava

2013

DANIEL BRUSTOLIN LUDWIG

**Estudo dos efeitos antifúngico e citotóxico da curcumina na presença
de antioxidantes.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Profa. Dra. Rubiana Mara Mainardes

Guarapuava

2013

Catálogo na Publicação

Biblioteca Central da UNICENTRO, Campus Guarapuava

Ludwig, Daniel Brustolin

L948e Estudo dos efeitos antifúngico e citotóxico da curcumina na presença de antioxidantes / Daniel Brustolin Ludwig. -- Guarapuava, 2013

xiv, 69 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual do Centro-Oeste em associação ampla com a Universidade Estadual de Ponta Grossa, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, 2013

Orientador: Najeh Maissar Khalil

Co-orientadora: Rubiana Mara Mainardes

Banca examinadora: Katia Sabrina Paludo, Paulo César Ghedini

Bibliografia

1. Farmácia. 2. Curcumina. 3. Atividade antifúngica. 4. Antioxidante. 5. Atividade citotóxica. I. Título. II. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

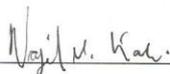
CDD 615.7

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIEL BRUSTOLIN LUDWIG

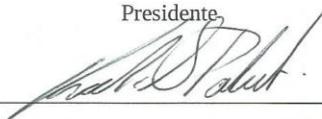
ESTUDO DOS EFEITOS ANTIFÚNGICO E CITOTÓXICO DA CURCUMINA NA PRESENÇA DE ANTIOXIDANTES

Dissertação aprovada em 26/08/2013 como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas, associação ampla entre a Universidade Estadual do Centro-Oeste, UNICENTRO e Universidade Estadual de Ponta Grossa, UEPG, área de concentração em Fármacos, Medicamentos e Biotecnologias Aplicadas à Farmácia, pela seguinte Banca Examinadora:



Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil - UNICENTRO

Presidente



Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo - UNICENTRO

Membro



Prof. Dr. Paulo César Ghedini - UFG

Membro

GUARAPUAVA-PR

2013

“Aprenda como se você fosse viver para sempre.

Viva como se você fosse morrer amanhã.”

Mahatma Gandhi

Dedicatória

Dedico este trabalho às pessoas que possuem um amor incondicional por mim e eu por eles; meu pai, minha mãe, minha irmã e meu irmão.

"Se quisermos ajudar transformar o mundo, precisamos estar com o ouvido no coração
de Deus e a mão no pulso do tempo."

Pe. José Kentenich

Agradecimentos

A Deus, por permitir a realização de um sonho e por saber que Ele sempre tem um plano de vida já traçado para cada um de nós.

A Nossa Senhora, por nos acolher em seu coração maternal e nos conduzir sempre pelos caminhos já escolhidos por Deus, e por mais tortuosos que sejam estes caminhos, ela nunca nos deixa sozinhos.

Aos meus pais Marcos e Maria Clara e à minha irmã Débora e meu irmão Diogo, pelo amor, carinho, atenção e apoio que sempre dedicaram a mim.

Aos demais familiares, minha avó Eny, tias, tios, primos e primas, por todo apoio, preocupação e orações em todos os momentos durante todo este tempo.

Ao meu orientador, Professor Najeh e a minha co-orientadora, Professora Rubiana, pela amizade e por todos os ensinamentos partilhados neste período. Com certeza, ainda muitos trabalhos virão e nossa amizade se fortalecerá ainda mais.

Um agradecimento especial às amigas e companheiras Lori, Lu Camargo e Thaysa. Sem vocês a realização deste trabalho não teria sido possível. Quantos momentos vocês abriram mão do tempo de vocês em meu auxílio. Tudo que eu disser ou fizer não pagará o que fizeram por mim. Sou muito grato e peço que Deus sempre abençoe vocês e suas famílias.

Aos amigos e colegas de mestrado, em especial Ana Cristina, Anderson, Clauberto, João Luiz (*in memoriam*), Luiz Augusto, Talita e Viviane, pelos momentos compartilhados em nossas aulas, experimentos e conversas, enfim, por tudo que vivemos neste período. Foi excelente saber que estivemos no mesmo barco.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Nanotecnologia Farmacêutica, por todos os momentos e trabalhos que tivemos nestes anos e que muitos outros ainda possam surgir. Por nossos cafés com bolacha nas tardes, nossas alegrias e risadas e também pelo compartilhamento de nossas preocupações. Agradeço vocês Aline, Aline Zgoda, Bárbara, Bruno, Carol, Cassieli, Clarissa, Clescila, Daniele, Débora, Diani, Emilli, Gabriela, Guilherme, Ivan, Jheneffer, Juliana de Andrade, Juliana Kovalczuk, Larissa, Leizi, Lígia, Lualís, Luciana Dalmolin, Michel, Patrícia, Raíssa, Silvana, Suelen, Thuane e Ynaê.

As professoras Tânia (UNICENTRO) e Katia (UEPG) pelo auxílio com os experimentos realizados com as células e contribuições nas bancas de qualificação e defesa respectivamente. Com certeza agregaram muito ao meu crescimento científico.

Aos professores David (UNICENTRO) e Paulo (UFG) pelas contribuições nas bancas de qualificação e defesa respectivamente.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas que nos proporcionaram adquirir novos conhecimentos.

A todos os demais funcionários da UNICENTRO que de alguma forma participaram deste período.

Aos integrantes e coordenadores do Departamento de Farmácia pelo apoio e compreensão nos momentos em que não pude estar presente nas atividades do departamento.

A CAPES pelo período em que recebi bolsa de estudos.

Filosofamos, discutimos, questionamos, aprendemos, e quando aprendemos novas dúvidas surgem e este processo inicia-se novamente, assim constrói-se o conhecimento. Muito obrigado a todos vocês que fizeram e fazem parte deste processo e principalmente, da minha vida.

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS	14
1. RESUMO.....	15
2. ABSTRACT	16
3. REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO.....	17
3.2 CÂNCER	18
3.2.1 PATOGENIA DO CÂNCER	19
3.3 DOENÇAS FÚNGICAS	20
3.4 CURCUMINA	21
3.5 ÁCIDO ASCÓRBICO (VITAMINA C)	25
3.6 GLUTATIONA.....	27
3.7 N-ACETILCISTEÍNA	27
4. OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GERAL.....	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
5. MATERIAIS E MÉTODOS	29
5.1. REAGENTES.....	29
5.2. EQUIPAMENTOS	30
5.3. MÉTODOS	30
5.3.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA.....	30
5.3.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE CÉLULAS TUMORAIS	32
5.3.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE ERITRÓCITOS.....	33
5.3.4. ESTABILIDADE DA CURCUMINA EM MEIO FISIOLÓGICO	33
5.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
6.1. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE CANDIDA SPP.....	34
6.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE CRYPTOCOCCUS SPP.....	37
6.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA CURCUMINA ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO EM CÉLULAS HEP-2.....	40
6.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA CURCUMINA ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO EM CÉLULAS HRT-18	45
6.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE ERITRÓCITOS	52

6.6. TESTE DE ESTABILIDADE DA CURCUMINA.....	54
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	58
8. CONCLUSÕES	60
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61
10. ANEXO I.....	71

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ativadores e inibidores das ERO.

Figura 2: Estrutura química da curcumina.

Figura 3: *Curcuma longa*.

Figura 4: Estrutura química do ácido ascórbico.

Figura 5: Estrutura química da glutathione.

Figura 6: Estrutura química da N-acetilcisteína.

Figura 7: Associação curcumina / N-acetilcisteína e curcumina / glutathione testadas em cepa clínica de *C. parapsilosis*.

Figura 8: Associação curcumina / N-acetilcisteína e curcumina / glutathione testadas em cepa ATCC 90112 de *C. neoformans*.

Figura 9: Associação curcumina / ácido ascórbico testadas em células HEp-2 no período de 24 horas.

Figura 10: Associação curcumina / ácido ascórbico testadas em células HEp-2 no período de 48 horas.

Figura 11: Associação curcumina / ácido ascórbico testada em células HRT-18 no período de 24 horas.

Figura 12: Associação curcumina / ácido ascórbico testada em células HRT-18 no período de 48 horas.

Figura 13: Avaliação da citotoxicidade sobre células normais.

Figura 14: Teste de estabilidade curcumina e glutathiona em tampão fisiológico.

Figura 15: Teste de estabilidade curcumina e N-acetilcisteína em tampão fisiológico.

Figura 16: Teste de estabilidade curcumina e ácido ascórbico em tampão fisiológico.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados para ensaio de atividade antifúngica com cepa clínica de *C. neoformans*.

Tabela 2: Análise morfológica no ensaio de atividade antitumoral da curcumina em associação ao ácido ascórbico sobre células de linhagem tumoral HRT-18 no período de 24 horas.

Tabela 3: Análise morfológica no ensaio de atividade antitumoral da curcumina em associação ao ácido ascórbico sobre células de linhagem tumoral HRT-18 no período de 48 horas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATCC - American Type Culture Collection.

CIM – Concentração inibitória mínima.

COX-2 – Ciclooxygenase-2.

DMSO – Dimetilsulfóxido.

ERO – Espécies reativas do oxigênio.

HEp-2 – Células de carcinoma laríngeo humano.

HRT-18 - Células humanas de tumor colorretal.

LED – Diodo emissor de luz.

MTT - [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)].

PBS – Tampão fosfato salina.

UFC – Unidades formadoras de colônia.

1. RESUMO

A curcumina, um polifenol extraído da planta *Curcuma longa*, é um composto de grande relevância no tratamento e prevenção de diversas patologias devido a suas propriedades biológicas, como antioxidante, antitumoral e anti-inflamatória. O efeito antifúngico, sobre diversos tipos de cepas, é outra atividade associada à curcumina. A curcumina sofre forte degradação quando em meio de pH neutro à básico, a qual pode ser minimizada com a adição de substâncias com propriedades antioxidantes, como o ácido ascórbico, a glutatona e a N-acetilcisteína. Com isto, o objetivo deste trabalho, é o de avaliar o efeito antifúngico e citotóxico da curcumina, na ausência ou na presença dos antioxidantes ácido ascórbico, glutatona e N-acetilcisteína. Os resultados obtidos demonstraram que a curcumina associada aos antioxidantes frente às cepas de *Candida spp* e *Cryptococcus spp*, apresentou efeito complementar pronunciado, devido à redução no crescimento das cepas, avaliadas através da contagem de colônias; porém, algumas cepas clínicas e uma cepa ATCC de *Candida spp* não apresentaram esse efeito. A curcumina e os antioxidantes, através de testes com células normais (eritrócitos), demonstraram que não houve efeito citotóxico nas concentrações testadas. Os ensaios sobre células de linhagem tumoral, HEP-2 e HRT-18, avaliados pelo método do MTT e pela morfologia celular, demonstraram aumento do efeito da curcumina com a associação do ácido ascórbico. Também foi observada proteção na degradação da curcumina em meio fisiológico com a aplicação de diodo emissor de luz na presença dos antioxidantes. Conclui-se que a curcumina, na presença de substâncias antioxidantes como, glutatona, N-acetilcisteína e ácido ascórbico, tem sua estabilidade aumentada em meio fisiológico demonstrando um efeito complementar destas substâncias, garantindo desta forma um aumento na atividade antifúngica e citotóxica da curcumina.

Palavras-chave: Curcumina, atividade antifúngica, antioxidante, atividade citotóxica.

2. ABSTRACT

The curcumin, a polyphenol extracted from the plant *Curcuma longa* is a compound of great relevance in the treatment and prevention of various diseases due to their biological properties such as antioxidant, anti-inflammatory and antitumoral. The antifungal effect on various types of strains, is another activity associated with curcumin. The curcumin degradation is strongly when using neutral pH to basics, which can be minimized with the addition of substances with antioxidant properties, such as ascorbic acid, glutathione and N-acetylcysteine. With this, the aim of this work is to evaluate the antifungal and cytotoxic effect of curcumin in the absence or in the presence of antioxidant ascorbic acid, glutathione and N-acetylcysteine. The results showed that curcumin associated with antioxidants against the strains of *Candida spp* and *Cryptococcus spp* showed pronounced complementary effect due to the reduction in the growth of the strains evaluated by counting colonies, but some clinical strains and one ATCC strain of *Candida spp* not show this effect. Curcumin and antioxidants, by testing normal cells (erythrocytes), showed no cytotoxic effect at the concentrations tested. Tests on tumor cell line, HEP-2 and HRT-18, evaluated by MTT method and the cell morphology, demonstrated an increased effect of curcumin with the combination of ascorbic acid. Protection was also observed in the degradation of curcumin in physiological medium by applying light emitting diode in the presence of antioxidants. It is concluded that curcumin in the presence of antioxidants as glutathione, N-acetylcysteine and ascorbic acid have increased stability in physiological media demonstrating a complementary effect of these substances, thus ensuring an increase in cytotoxic and antifungal activity curcumin.

Key words: Curcumin, antifungal, antioxidant, cytotoxic activity.

3. REVISÃO DA LITERATURA

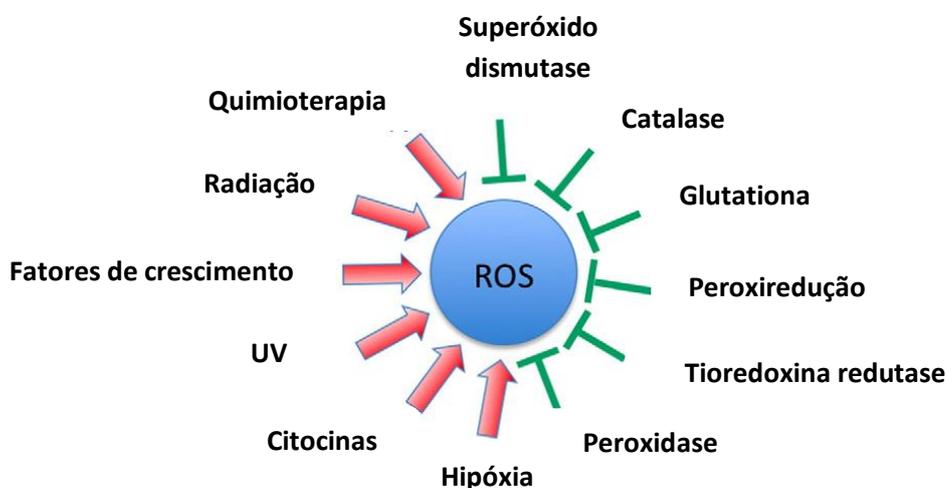
3.1 ESTRESSE OXIDATIVO

Estados de saúde e de doença dependem do meio ambiente, pois através dele o organismo humano entra em contato com inúmeras substâncias, químicas e poluentes, que possuem relação direta com a saúde. Esta exposição pode desencadear problemas relacionados à saúde que incluem o câncer, problemas crônicos de pulmão, diabetes e problemas neurodegenerativos (FRANCO *et al.*, 2009; HOPPS *et al.*, 2010), além de estar diretamente interligada aos processos inflamatórios crônicos (REUTER *et al.*, 2010). A relação entre os riscos ambientais e a progressão das doenças está mais clara entre os pesquisadores e tornou-se interesse de saúde pública (FRANCO *et al.*, 2009).

O estresse oxidativo consiste em um desequilíbrio no organismo entre a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO) e a capacidade antioxidante do mesmo para combater os intermediários reativos e assim provocar a detoxificação do organismo (ROSENFELDT *et al.*, 2013). Como consequência, lipídeos, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos podem ser afetados (BARGAGLI *et al.*, 2009), causando desde dano celular leve a, em maior intensidade, apoptose e necrose (ROSENFELDT *et al.*, 2013).

Em estudo realizado por Reuter *et al.*, (2010), analisou-se a ligação entre o estresse oxidativo, os processos inflamatórios e o câncer. Dentro deste processo, muitas substâncias e também processos físicos e biológicos estão envolvidos na ativação ou inibição da produção de ERO (Figura 1).

Figura 1: Ativadores e inibidores das ERO. Adaptado (REUTER *et al.*, 2010).



Hopps *et al.*, (2010) avaliaram a ação do estresse oxidativo sobre a síndrome metabólica no desenvolvimento de complicações cardiovasculares e metabólicas, onde observaram a ligação entre o estresse oxidativo e diversas doenças como: diabetes mellitus, hipertensão, obesidade, dislipidemia e inflamação, concluindo que o estresse oxidativo está relacionado com a maioria dos problemas inerentes à síndrome metabólica.

Diversas substâncias foram analisadas para o combate e prevenção dos males causados pelo estresse oxidativo, entre elas, a curcumina. Fiorillo *et al.* (2008) estudaram a proteção exercida pela curcumina em células cardíacas no processo de isquemia-reperfusão. A comparação entre o grupo de células controle e as células cardíacas isquêmicas demonstrou a presença de uma concentração maior de ERO nas células afetadas. Observou-se que, quando as células foram pré-tratadas com curcumina, uma menor quantidade de ERO foi produzida, reduzindo desta maneira os efeitos do estresse oxidativo.

Outro estudo (Reeta *et al.*, 2009), avaliou o efeito da curcumina, sobre o comprometimento cognitivo e o estresse oxidativo causados pela fenitoína em ratos, ocasionando a deficiência de aprendizado e memória. Observou-se que a administração da curcumina concomitantemente à fenitoína preveniu de maneira efetiva o comprometimento cognitivo e o estresse oxidativo causado pela fenitoína.

3.2 CÂNCER

O câncer é um processo em que ocorre a mutação do DNA de células somáticas, onde muitos mecanismos tentam evitar esta divisão celular incontrolada (SA & DAS, 2008). São diversas as causas do câncer, variando entre internas e externas ao organismo, estando inter-relacionadas. Estima-se que 5-10 % dos casos de cânceres humanos são por fatores genéticos, enquanto os demais casos são por estilo de vida. As causas internas, na grande maioria, são geneticamente pré-determinadas e estão relacionadas à capacidade que o organismo tem em defender-se de agressões externas; já as causas externas, fazem parte do meio ambiente e de hábitos ou costumes próprios de um ambiente social e cultural. Estes fatores podem interagir de diversas formas e desta maneira aumentar a probabilidade de transformações malignas em células normais (ANAND *et al.*, 2008; INCA, 2011).

De acordo com os diferentes tipos celulares há uma grande variabilidade nos tipos de câncer conhecidos. Quando o câncer tem origem em tecidos epiteliais como pele ou mucosas é denominado carcinoma, quando aparece em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado sarcoma. As células tumorais invadem tecidos, órgãos e células, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, causando desta maneira a metástase (INCA, 2011).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima-se que durante o período de 2007 a 2030 aumentará em 45% a mortalidade por câncer a nível mundial. Parte deste aumento deve-se pelo crescimento demográfico e pelo envelhecimento da população. Na maioria dos países desenvolvidos o câncer é a segunda causa principal de morte, depois apenas das doenças cardiovasculares (OMS, 2008).

Alguns fatores de risco que estão associados ao aparecimento do câncer são: modo de vida pouco saudável, como o consumo de álcool, tabagismo, falta de atividade física e dieta inadequada; exposição à carcinógenos; o meio ambiente, por exemplo, a contaminação de ar em locais fechados; radiação ultravioleta ou ionizante e algumas infecções, como a hepatite B ou a infecção por Papiloma Vírus Humano (OMS, 2008).

3.2.1 PATOGENIA DO CÂNCER

A célula normal torna-se cancerosa através de uma alteração no DNA, sendo que são duas as principais alterações genéticas que levam ao câncer: a inativação de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogenes em oncogenes. A inativação de genes supressores tumorais está relacionada com o aparecimento do câncer, pois as células normais possuem genes capazes de suprimir a alteração maligna, e caso ocorra a inativação destes genes a supressão não ocorre. Os proto-oncogenes estão envolvidos no crescimento e diferenciação de células normais, mas podem ser convertidos em oncogenes através de mutações ou, por exemplo, pela ação de certos vírus, o que contribuiria para a formação de células tumorais (RANG *et al.*, 2004).

Existem muitas diferenças na duração do ciclo das mais diversas células, mas todas seguem um padrão parecido durante a divisão, dividido em quatro partes: Primeira – fase anterior à síntese de DNA (G₁); Segunda – fase de síntese do DNA (S); Terceira – fase de intervalo após o término da síntese do DNA (G₂); Quarta – fase mitótica (M).

Nesta última fase a célula possui duplo complemento de DNA e divide-se em duas células-filhas G₁, sendo que cada uma destas células pode iniciar novamente o ciclo ou passar para uma fase não proliferativa (G₀). Cada uma destas fases é regulada por cinases dependentes de ciclinas específicas (CDK) que são ativadas por proteínas reguladoras chamadas ciclinas e inibidas por proteínas como a p16. Quando ocorrem mutações ou perda da p16, de outros componentes da via do retinoblastoma, da própria proteína retinoblastoma; quando há aumento da atividade das ciclinas ou das CDK, ocorre uma proliferação grande de células tumorais. Pela importância que o DNA apresenta, existem alguns mecanismos que o protegem. Por exemplo, se uma célula expressar a proteína p53 normal, a lesão do DNA ativa uma função de controle normal e as células lesadas sofrerão apoptose ou morte celular programada quando chegarem ao estágio G₁/S. Quando ocorre uma mutação ou ausência do produto do gene p53 e se a função de controle falhar, a célula não irá para a via apoptótica e segue pela fase S. Na fase G₂/M existem outras proteínas de controle que monitoram a integridade do DNA e podem retardar a progressão para a fase M. Com a ausência ou a ocorrência de mutações nestes pontos de controle ocorre a permissão para que estas células continuem na fase mitótica e fazem com que a célula sobreviva à lesão do DNA (BRUNTON *et al.*, 2006).

O processo de carcinogênese é dividido em vários estágios, entre os quais: i) Estágio de iniciação – onde as células sofrem alguma mutação em seus genes pelo efeito de um agente carcinogênico, benzopireno, por exemplo, ii) Estágio de promoção – as células com alterações genéticas sofrem o efeito dos agentes cancerígenos e a célula iniciada transforma-se em célula maligna e para isso é necessário um longo contato com o agente cancerígeno e iii) Estágio de progressão – é a fase onde as células se multiplicam descontroladamente e de forma irreversível. As células cancerosas são menos especializadas e com a substituição das células normais pelas cancerosas, os tecidos invadidos perdem suas funções (ALMEIDA *et al.*, 2005).

3.3 DOENÇAS FÚNGICAS

A candidíase é a patologia causada por fungos *Candida spp*, tendo como principal agente a *C. albicans*. Este fungo é o principal responsável pelos casos de micoses infantis, causando desde a infecção cutaneomucosa até infecções invasivas graves em

pacientes com fatores de risco, tendo grande importância clínica pela gravidade e altos índices de mortalidade (FIGUERAS *et al.*, 2011).

A *Candida* pertence à família das *Cryptococcaceae* e as principais espécies que causam infecções em humanos são: *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (FIGUERAS *et al.*, 2011). A importância clínica existe não somente para casos de infecções infantis, mas também infecções oportunistas em pacientes internados em unidades de terapia intensiva principalmente para os adultos (CERVERA, 2012). Os principais casos de infecções oportunistas em pacientes internados afetam os que estão em tratamento onco-hematológico, que receberam transplante de órgãos, pacientes que ingressaram na unidade de terapia intensiva, pacientes pediátricos e nos demais que possuem alto risco de infecção (AGUADO *et al.*, 2011).

A cryptococose, doença que afeta em grande número pessoas com deficiências no sistema imune, como por exemplo, portadores do vírus HIV ou pacientes que sofreram algum tipo de transplante, pode ser causada basicamente por duas espécies: *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii* (LOCKHART *et al.*, 2012).

Infecções pulmonares causadas por *C. neoformans* ou *C. gattii* ocorrem principalmente após inalação de partículas infectadas, as quais penetram nos alvéolos. Os seres humanos, desde a infância, têm contato com a espécie *C. neoformans*, porém, em pacientes imunossuprimidos este fungo pode disseminar-se e afetar outros órgãos e sistemas, incluindo o sistema nervoso central, resultando em uma meningoencefalite que pode ser fatal se não tratada à tempo (BOVERS *et al.*, 2008).

3.4 CURCUMINA

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

Figura 2: Estrutura química da curcumina.

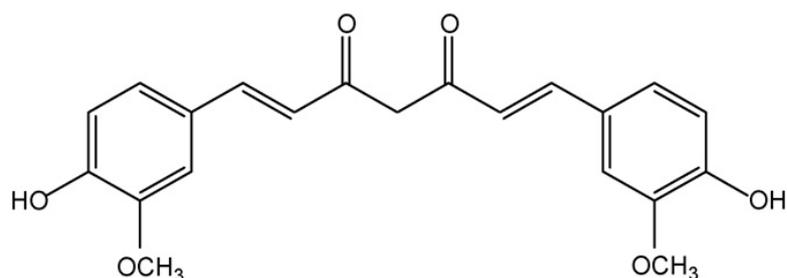


Figura 3: a) Curcumina – planta (www.plant-pictures.com/); b) Curcumina – rizomas (www.pharmaciaessentia.com.br)

a)



b)



A curcumina é um poderoso antioxidante e inibe a ação da enzima ciclooxigenase 2 (COX 2), em parte, por interferência pela ativação do fator de transcrição NFκB. *In vitro*, a curcumina inibe o crescimento de diferentes tipos de células de câncer (MARCZYLO *et al.*, 2007).

Inúmeros estudos indicam que a curcumina contribui para a prevenção e tratamento de câncer e outras doenças crônicas (AGGARWAL *et al.*, 2003; GOEL *et al.*, 2008; KÖSTEL *et al.*, 2012). Experimentos indicaram um efeito de não proliferação de células de carcinoma e proporcionaram a apoptose em células tumorais de leucemia mieloide (SHARMA *et al.*, 2005). A curcumina, como parte da dieta, inibe significativamente o tamanho do tumor em modelos animais (HEATH *et al.*, 2003).

Este polifenol, além de alvos isolados, como por exemplo, COX-2, TNF, HER-2, possui ação sobre diversos alvos múltiplos, entre os quais: citocinas inflamatórias, enzimas, fatores de crescimento, receptores, moléculas de adesão, proteínas anti-

apoptóticas, proteínas quinases e fatores transcricionais (KUNNUMAKKARA *et al.*, 2008).

Ibrahim *et al.*, (2011), analisaram a ação apoptótica sobre células ENU 1564 da glândula mamária de ratos que possuem características de serem células malignas e que provocam metástase. O objetivo principal do estudo foi determinar o mecanismo principal pelo qual a curcumina induz a apoptose neste tipo de células *in vitro* além de estudar os efeitos no potencial de membrana mitocondrial e a homeostase do Ca^{2+} mitocondrial. Com os resultados obtidos foi possível concluir que a elevação dos níveis de Ca^{2+} mitocondrial foi determinante para a indução de apoptose pela curcumina nas células ENU 1564. A geração de espécies reativas do oxigênio e a inibição da oncoproteína Bcl-2 foram outros mecanismos encontrados nesta pesquisa para a ação apoptótica da curcumina.

A curcumina também induziu apoptose em células HepG2, associada ao potencial de membrana mitocondrial e à concentração intracelular de Ca^{2+} livre (WANG *et al.*, 2011).

Em outro estudo, Sun *et al.*, (2012) estudaram o efeito pró-apoptótico da curcumina sobre os queratinócitos pela indução do TNF- α em células HaCat e também a expressão dos receptores TRAIL presentes nestas células. O grupo observou que a curcumina induziu apoptose nas células apenas quando TNF- α e/ou receptores TRAIL estavam presentes.

Soluções de curcumina demonstraram efeito na inibição da expressão do gene WT1 em linhagem de células K562 leucêmicas. Esta regulação não foi resultado dos processos de degradação de proteína ou RNAm das células K562. Ensaio de imunoprecipitação da cromatina e de luciferase demonstraram que a curcumina pura age na atividade auto-regulatória do WT1 causando uma diminuição da expressão deste gene. Através destes resultados pôde-se perceber que a regulação do gene WT1 é fundamental para a inibição do crescimento das células tumorais pela curcumina pura (SEMSRI *et al.*, 2011).

Kunwar *et al.*, (2008) compararam os efeitos de captação da curcumina de duas linhagens de células normais, linfócitos do baço e células NIH3T3, e duas linhagens tumorais, EL4 e MCF7. A verificação da captação foi determinada por espectroscopia

de fluorescência e desta maneira observou-se quanta curcumina intracelular estava presente em cada uma das linhagens de células. Em relação à citotoxicidade, houve um aumento direto com o aumento das concentrações de curcumina e também uma citotoxicidade maior para as células EL4 e MCF7 em comparação com as células NIH3T3.

Além do câncer, os usos da curcumina são bem documentados no tratamento de problemas respiratórios como asma, alergia, problemas de fígado, anorexia, reumatismo, diabetes e sinusite (SHAIKH *et al.*, 2009). Também, em várias doenças crônicas que apresentam inflamação, a curcumina apresentou potencial terapêutico, entre elas, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla, epilepsia, problemas cerebrais, psoríase, colite e AIDS (AGGARWAL & HARIKUMAR, 2009).

A atividade antifúngica é outro importante efeito biológico da curcumina, em especial frente à *Candida spp* (KHAN *et al.*, 2012). Em experimento realizado por Jianhua & Hai (2009), a curcumina foi testada em cepas de *C. albicans* para a verificação da ação deste polifenol na inibição do crescimento das cepas, comprovando-se a existência deste efeito na utilização de diferentes concentrações de curcumina.

Efeito da curcumina sobre candidíase orofaríngea foi observado em camundongos com modelo de asma crônica, nos níveis de óxido nítrico sérico e na histopatologia do pulmão, tendo a candidíase orofaríngea como o efeito colateral mais importante nos tratamentos atuais de asma crônica. Pelo fato da curcumina apresentar uma boa atividade antifúngica e anti-inflamatória, esta foi uma boa opção para pesquisa neste tipo de tratamento. A diminuição da carga oral fúngica presente nas amostras em comparação com a utilização da dexametasona somente, foi acentuadamente maior, já os efeitos na redução das concentrações séricas de óxido nítrico os resultados foram bem próximos na comparação entre curcumina e dexametasona (KARAMAN *et al.*, 2011).

A curcumina mostrou eficácia no tratamento de diversas cepas de *Candida spp* sensíveis ao fluconazol e isolados clínicos resistentes (KHAN *et al.*, 2012). Os testes de atividade hemolítica para o maior CIM₉₀ (Concentração Inibitória Mínima) da curcumina revelaram melhor segurança na utilização da mesma em relação ao fluconazol, apresentando uma porcentagem de hemólise de 11,45% contra 20% para o fluconazol. Neste caso, a curcumina possui um possível efeito antifúngico devido à

hidrofóbica da membrana. Esta combinação incorporada a drogas anticancerígenas, aparentemente, aumentou a eficácia do sistema de transporte das nanopartículas (MORIBE *et al.*, 2011).

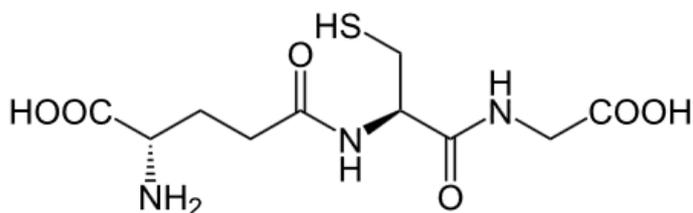
Os efeitos anticarcinogênicos e antioxidantes do ácido ascórbico há tempos vêm sendo estudados, de maneira isolada e em comparação ou associação com outras substâncias antioxidantes e com o mesmo potencial. Um estudo conduzido por Sahu e Washington (1992) ajudou a determinar os efeitos do ácido ascórbico e da curcumina sobre o dano nuclear ao DNA induzido por quercetina, a peroxidação lipídica e a degradação proteica. Observou-se neste estudo que tanto o ácido ascórbico quanto a curcumina podiam agir como antioxidantes, mas também como pró-oxidantes, dependendo da presença e concentração de metais como o ferro e o cobre.

Em estudo recente, Khalil *et al.*, (2012) estudaram os efeitos antifúngico e antioxidante do ácido ascórbico e da curcumina de maneira isolada e em associação. A ação antioxidante da associação do ácido ascórbico com a curcumina foi superior em comparação à utilização dos compostos separadamente tanto para os testes sobre o radical ABTS quanto para os testes sobre o oxidante HOCl. Também avaliaram a atividade antifúngica desta associação calculando as concentrações inibitórias mínimas (CIM) para cepas de *C. albicans* ATCC e isolados clínicos, dentre as quais, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis*. Os resultados obtidos com a utilização dos compostos isolados demonstrou que o ácido ascórbico não apresenta atividade antifúngica nas concentrações testadas, já a curcumina, testada isoladamente, apresentou um CIM superior a 5 µg.mL⁻¹ para *C. krusei* ATCC 4258, baixando este valor para 1,25 µg.mL⁻¹ após associação. Uma redução bastante acentuada foi observada no isolado clínico de *C. albicans*, onde a curcumina apresentou um CIM de 25 µg.mL⁻¹, e com a adição do ácido ascórbico este CIM reduziu para 1 µg.mL⁻¹. Para outro isolado clínico, a *C. tropicalis*, uma redução do CIM de 5 µg.mL⁻¹ para 1,25 µg.mL⁻¹ ocorreu após a associação dos compostos. A *C. albicans* ATCC 14053, para todas as três concentrações de ácido ascórbico adicionadas à curcumina apresentou um CIM de 0,625 µg.mL⁻¹, já a *C. albicans* ATCC 6458 que apresentou um CIM de 0,625 µg.mL⁻¹ com a curcumina apenas, após a associação com o ácido ascórbico reduziu este CIM pela metade. Com isso, esse estudo demonstrou que a associação com o ácido ascórbico ampliou as atividades antioxidante e antifúngica da curcumina.

3.6 GLUTATIONA

A glutaciona é um composto tiólico presente tanto nos eucariontes quanto nos procariontes (MEISTER, 1981). Não é necessária sua obtenção pela alimentação, pois a mesma é produzida em praticamente todas as células animais pela ação de duas enzimas: a γ -glutamilcisteína sintetase e a glutaciona sintetase (MEISTER, 1994). Este composto é responsável pela prevenção e redução da ação de uma quantidade grande de doenças que afetam os seres humanos, dentre as quais, muitos tipos de cânceres, inflamações, problemas cardíacos, diabetes, doenças de Parkinson e Alzheimer entre outras, tendo como principal atividade nos seres humanos a detoxificação das ERO (GHANTA & CHATTOPADHYAY, 2011).

Figura 5: Estrutura química da glutaciona.



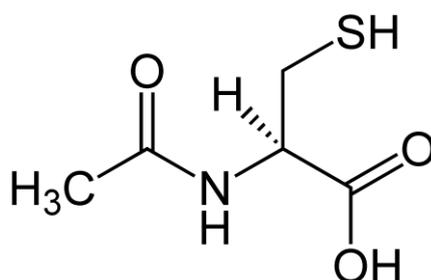
A molécula da glutaciona existe na forma reduzida e na forma oxidada. Quando estiver na forma reduzida, o grupo tiol da cisteína está hábil para doar um elétron redutor diretamente para moléculas instáveis como ERO. Após doar este elétron, a molécula da glutaciona passa a ser reativa, porém, reagem com outra molécula de glutaciona reduzida e desta forma origina uma molécula de glutaciona oxidada (JOZEFCAK *et al.*, 2012).

Estudos comprovaram que os efeitos maléficos da ausência de glutaciona podem ser prevenidos pela administração de ascorbato, provando uma boa inter-relação entre este composto e a glutaciona (MEISTER, 1994).

3.7 N-ACETILCISTEÍNA

A N-acetilcisteína é uma molécula que possui propriedades antioxidantes, sendo muito utilizada para repor os níveis de glutaciona nas células, pois a mesma é precursora desta, o que contribui na inativação de ERO presentes nas células. Uma das principais funções da N-acetilcisteína é manter o balanço oxidativo nas células (DEAN *et al.*, 2011).

Figura 6: Estrutura química da N-acetilcisteína.



Hong *et al.*, (2001), estudando o efeito antioxidante da rebamipida sobre os radicais livres derivados do oxigênio, os quais são produzidos por indução dos neutrófilos sobre o *Helicobacter pylori*, compararam o efeito deste medicamento com o efeito antioxidante de três substâncias reconhecidas por possuírem esta propriedade e bastante estudadas, sendo estas: a N-acetilcisteína, a glutatona e o ácido ascórbico. As atividades antioxidantes foram determinadas por dois ensaios distintos, o ensaio quimioluminescente luminol-dependente e o ensaio de auto-oxidação do pirogallol. Como resultados, o grupo obteve no ensaio de auto-oxidação uma resposta decrescente na atividade antioxidante para glutatona, ácido ascórbico, rebamipida e N-acetilcisteína, podendo, desta maneira provar o efeito antioxidante do medicamento em comparação com estes três compostos com atividade antioxidante comprovada.

A N-acetilcisteína também apresentou uma atividade complementar à curcumina na proteção contra a toxicidade causada pelo paracetamol no fígado e rins de ratos nos experimentos realizados por Kheradpezhough *et al.*, (2010). A observação dos resultados obtidos pelo grupo nas provas funcionais e nas análises histopatológicas levou à conclusão que a curcumina exerceu um efeito protetor prevenindo a maior parte dos danos causados no fígado e rins por altas doses de paracetamol, porém, quando esta foi utilizada em associação com a N-acetilcisteína os resultados foram ainda mais satisfatórios, pois foram utilizadas baixas doses tanto de curcumina quanto de N-acetilcisteína e o efeito protetor manteve-se, proporcionando com isto uma maior segurança na utilização da associação devido aos baixos efeitos colaterais como consequência das baixas doses utilizadas.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é determinar a atividade antifúngica das associações entre a curcumina com ácido ascórbico, glutatona ou N-acetilcisteína; análise do efeito da curcumina na ausência ou presença do ácido ascórbico em linhagens de células normais e tumorais HEP-2 e HRT-18 e avaliação da estabilidade da curcumina em tampão fisiológico.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a atividade antifúngica da associação entre a curcumina com o ácido ascórbico, glutatona ou N-acetilcisteína, sobre *Candida spp* e *Cryptococcus spp*.
- ✓ Avaliar a atividade anti-hemolítica da associação entre a curcumina com ácido ascórbico, glutatona ou N-acetilcisteína em células normais (eritrócitos).
- ✓ Avaliar a atividade antitumoral da associação entre curcumina e ácido ascórbico em linhagens de células tumorais HEP-2 e HRT-18.
- ✓ Avaliar o efeito exercido na velocidade de degradação da curcumina na presença ou ausência de glutatona, N-acetilcisteína ou ácido ascórbico em tampão fisiológico (pH 7,4).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1. REAGENTES

- ✓ Curcumina;
- ✓ Ácido ascórbico;
- ✓ Glutatona;
- ✓ N-acetilcisteína;
- ✓ Meio de cultura RPMI-1640;
- ✓ Meio de cultura ISCOVES;
- ✓ Agar sabouraud dextrose;
- ✓ Ácido 3-N-morfolino propanosulfônico (MOPS);
- ✓ NaCl;
- ✓ Água destilada.

Todos os reagentes foram adquiridos da empresa Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

5.2. EQUIPAMENTOS

- ✓ Câmara de fluxo laminar;
- ✓ Estufa para cultura de células;
- ✓ Estufa para cultura biológica;
- ✓ Purificador de água;
- ✓ Agitador magnético;
- ✓ Medidor de pH;
- ✓ Balança analítica;
- ✓ Leitor de microplacas;
- ✓ Espectrofotômetro UV-Vis;
- ✓ Diodo emissor de luz.

5.3. MÉTODOS

5.3.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os testes para avaliação da atividade antifúngica foram realizados baseados no documento M27-A2 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2002) com modificações.

a) Preparo do meio de cultura RPMI-1640

O meio de cultura utilizado para a realização dos testes e diluição das drogas foi o meio líquido RPMI-1640 (Himedia[®]) com glutamina e o indicador vermelho de fenol, sem bicarbonato, tamponado com ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico (MOPS) (Sigma[®]) 0,165 mol.L⁻¹; pH 7,0 ± 0,1 ajustado com solução de NaOH 1 mol.L⁻¹ em temperatura ambiente (25° C); esterilizado por filtração e armazenado a temperatura de 4° C.

b) Preparo do inóculo

Nos ensaios foram utilizadas num total de quatro culturas de cepas clínicas de *C. parapsilosis* (duas cepas), *C. utilis*, *C. tropicalis* e uma de *C. neoformans*, além de uma cepa de *C. albicans* ATCC 14053 e uma de *C. neoformans* ATCC 90112. Para o preparo das suspensões dos inóculos, com 24 horas de antecedência (para as cepas de

Candida) e 48 horas (para as cepas de *Cryptococcus*) realizou-se o repique das culturas puras pela técnica de esgotamento, em placas estéreis com ágar sabouraud dextrose, que permaneceram incubadas a temperatura constante de $35 \pm 0,5^\circ$ C. O inóculo foi preparado escolhendo-se cinco colônias de cada uma das culturas, as quais foram suspensas em cerca de 5 mL de solução salina estéril a 0,85%. A suspensão resultante foi agitada com auxílio de vórtex e a densidade celular ajustada em espectrofotômetro para obter a absorvância equivalente de uma solução-padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland, que em comprimento de onda de 530 nm corresponde a 0,08 a 0,1. O inóculo de trabalho foi produzido por duas diluições sucessivas de 1:50 seguida de uma diluição de 1:20 da suspensão-padrão com meio líquido RPMI-1640, resultando em inóculo com concentração entre 1×10^3 a 5×10^3 UFC.mL⁻¹.

c) Determinação da atividade antifúngica *in vitro*

Para os ensaios de avaliação da atividade antifúngica a curcumina foi diluída em etanol utilizando-se microtubos estéreis de plástico (tipo Eppendorf®). As concentrações finais utilizadas de curcumina foram: 1,95 µg.mL⁻¹, 0,975 µg.mL⁻¹ e 0,475 µg.mL⁻¹. As amostras de ácido ascórbico, glutationa e N-acetilcisteína foram preparadas em meio de cultura RPMI-1640 e nas mesmas concentrações para as três substâncias, tendo como concentrações finais os seguintes valores: 312,5 µg.mL⁻¹, 156,25 µg.mL⁻¹ e 78,125 µg.mL⁻¹.

Foram adicionados 100 µL do inóculo ajustado aos poços da microplaca, em seguida adicionados 5 µL cada de curcumina, glutationa e N-acetilcisteína, para os ensaios com *Candida*, e 5 µL cada de curcumina, ácido ascórbico, glutationa e N-acetilcisteína para os ensaios com *Cryptococcus*, sendo que o volume final de 200 µL foi completado com RPMI-1640. Todos os controles foram devidamente realizados, entre os quais, o controle negativo (contendo apenas o meio de cultura), controle positivo (meio de cultura e inóculo), controle do solvente da curcumina (etanol) e o controle com um agente antifúngico conhecido (anfotericina B). A microplaca foi incubada a $35 \pm 0,5^\circ$ C por 24h. O teste foi realizado em triplicata.

d) Leitura dos resultados

A eficácia *in vitro* da curcumina com a associação de glutationa e N-acetilcisteína frente a cepas clínicas de *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. utilis* e *C. albicans* ATCC

14053 e da curcumina em associação com o ácido ascórbico, glutatona e N-acetilcisteína em cepas ATCC 90112 e clínica de *C. neoformans*, foi determinada através da leitura visual da turvação dos poços da microplaca, em comparação com os controles utilizados no experimento (CLSI, 2002).

e) **Plaqueamento**

Em seguida da realização da leitura visual, através da turvação dos poços da microplaca, foi realizado o procedimento de plaqueamento. Uma diluição 1:20 foi realizada com o conteúdo de cada poço da microplaca e em seguida retirados 5 µL de cada diluição e colocados em placas de Petri contendo ágar sabouraud dextrose e realizado procedimento de espalhamento da amostra pelo ágar. As placas foram incubadas em condições de cultura ($35 \pm 0,5^\circ$ C por 24h) e após este período foi realizada a contagem das colônias para a determinação da quantidade de unidades formadoras de colônias (UFC).

5.3.2. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE CÉLULAS TUMORAIS

Foram utilizadas células de carcinoma laríngeo humano (HEp-2) e tumor colorretal humano (HRT-18) obtidas da American Type Culture Collection - ATCC (Rockville, MD, EUA). As células foram suspensas em meio de cultura RPMI-1640 contendo 5-10% de soro fetal bovino sendo distribuídas em placas de Petri ($5,0 \times 10^4$ células/placa). A contagem do número de células foi realizada em câmara de Neubauer. As células foram suspensas em meio de cultura. O ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método colorimétrico utilizando MTT-tetrazólio; [3-(4,5-dimetiazol-2il-2,5-brometo de difeniltetrazólio)] através de metodologia descrita por Stockert *et al.* (2012). As células suspensas foram distribuídas em placas de 96 poços na quantidade de $2,5 \times 10^4$ células/orifício e incubadas por 24h a 37° C com 5% CO_2 . Passado este tempo foram expostas à curcumina (30 µM a 10 µM) e ao ácido ascórbico ($12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $0,39 \mu\text{g.mL}^{-1}$), livres e em associação, por 24 e 48 horas nas mesmas condições anteriores. Após este período os poços foram lavados 3x com tampão PBS e em seguida adicionados 70 µL de MTT. Depois de 2 horas de incubação, o MTT foi retirado e adicionado 50 µL de etanol e 150 µL de uma solução contendo tampão PBS e isopropanol (1:1) para a solubilização dos cristais de formazan. A leitura do teste foi feita em 570 nm e 630 nm, sendo a absorbância proporcional ao número de células

vivas. Os experimentos foram realizados em triplicatas e os resultados analisados através de média e desvio padrão.

5.3.3. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE ERITRÓCITOS

Para a obtenção das hemácias foram coletados 5 mL de sangue total de indivíduos voluntários sadios, acima de 18 anos. A coleta foi efetuada por punção venosa periférica obedecendo às normas de biossegurança, como assepsia do local da punção utilizando álcool 70% e equipamento de proteção individual (luva de procedimento) pelo responsável pela coleta. Para todas as análises em que foram utilizadas amostras de sangue, os procedimentos foram iguais aos citados. O sangue coletado foi adicionado em tubo de vidro contendo 10 µL de heparina 5.000 UI e homogeneizado, sempre nessa mesma proporção. O sangue foi centrifugado por 5 minutos a 4° C e 1200 g, em seguida retirado o plasma e a camada de leucócitos por aspiração. A suspensão de hemácias foi lavada com solução gelada de tampão fosfato salina (PBS; 10 mmol.L⁻¹, pH 7,4 e NaCl 0,85%) por três vezes. As hemácias foram ressuspensas em PBS 50 mmol.L⁻¹, pH 7,4 acertando-se o volume globular para 5%. Diferentes concentrações da curcumina, ácido ascórbico, glutathione e N-acetilcisteína foram incubadas com a solução de hemácias 5% por 24 horas a temperatura de 37° C, sob constante homogeneização. A reação foi finalizada pela centrifugação da solução a 1200 g a 4° C por 5 minutos. Uma solução de anfotericina B preparada em DMSO na concentração de 250 µg.mL⁻¹ foi utilizada como controle positivo para a hemólise. O conteúdo de hemoglobina liberado, proporcional a citotoxicidade exercida (ou não) pelos compostos, foi determinado no sobrenadante através da medida da absorbância em 540 nm (DENG *et al.*, 2006; ESPADA *et al.*, 2008). Este ensaio foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual do Centro Oeste, sob nº do parecer: 113.217 e CAAE: 07776312.3.0000.0106.

5.3.4. ESTABILIDADE DA CURCUMINA EM MEIO FISIOLÓGICO

A estabilidade em solução fisiológica foi testada a partir do preparo de soluções mãe de curcumina, diluída em etanol, e glutathione, N-acetilcisteína e ácido ascórbico, diluídos em solução fisiológica. As concentrações finais foram de 25 µg.mL⁻¹ para a curcumina e de 200 µg.mL⁻¹ e 400 µg.mL⁻¹ para a glutathione, N-acetilcisteína e ácido ascórbico. Os ensaios foram realizados em PBS. Duas placas foram preparadas seguindo este procedimento, sendo que uma delas foi submetida à aplicação de diodo emissor de luz (LED) azul e a outra não.

Em diferentes intervalos de tempo, foram realizadas leituras em comprimento de onda de 340 nm a 550 nm analisando o decaimento da absorbância da curcumina.

5.3.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média e o desvio padrão foram utilizados para a apresentação dos resultados. As comparações estatísticas necessárias foram realizadas utilizando-se a ferramenta ANOVA com pós-teste de Tukey e intervalo de confiança de 95% e significância com $p < 0,05$.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE *CANDIDA SPP*

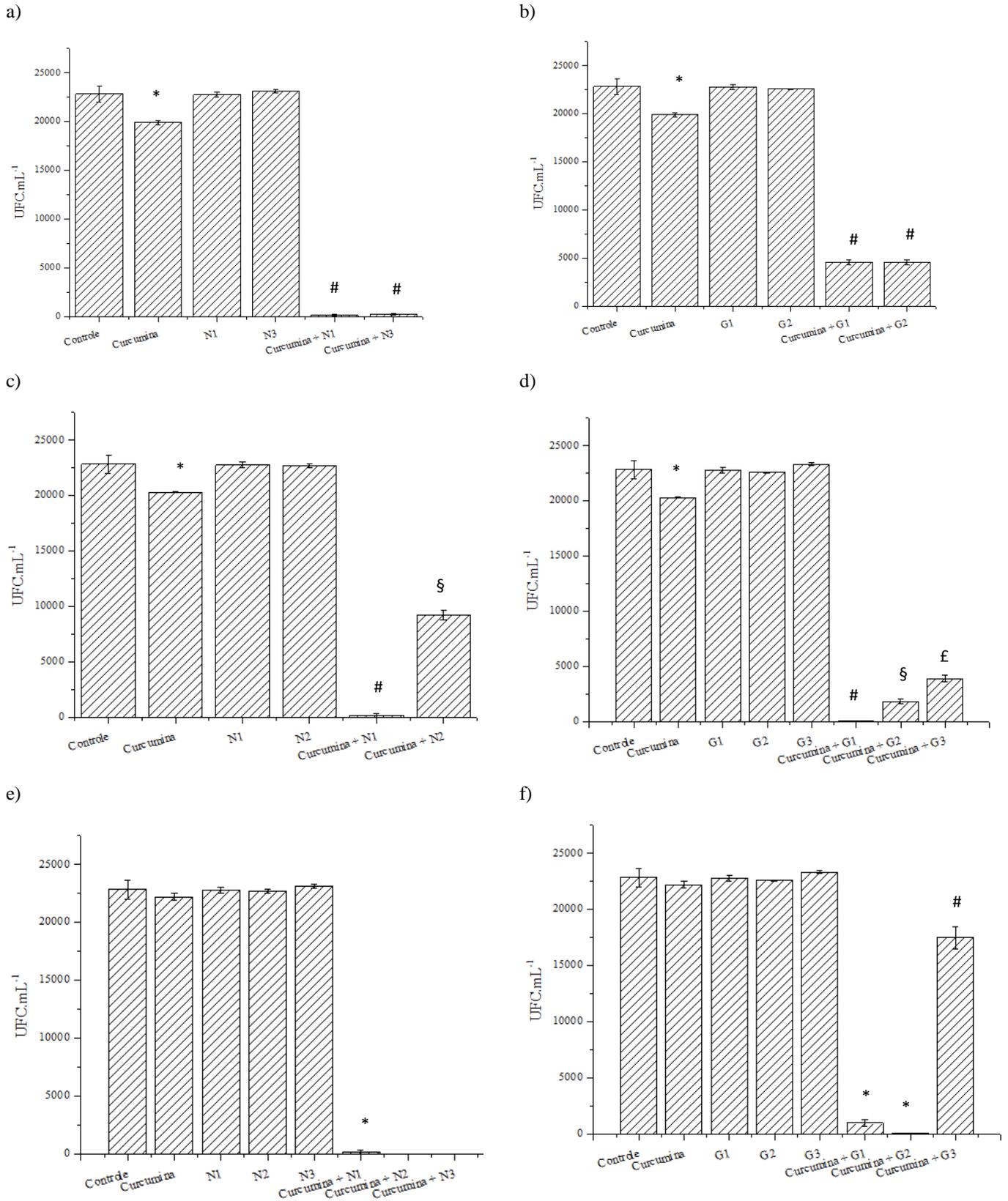
Doenças causadas por *Candida* estão entre os principais casos de micoses cutaneomucosas e até mesmo de infecções invasivas graves oportunistas, podendo acometer principalmente crianças (FIGUERAS *et al.*, 2011), pacientes em unidades de terapia intensiva (CERVERA, 2012), pacientes que receberam transplante de órgãos ou que estão em tratamento onco-hematológico, além de outros casos em que exista alta susceptibilidade à infecções (AGUADO *et al.*, 2011).

Os resultados obtidos com uma das cepas clínicas de *C. parapsilosis*, onde as três concentrações testadas de curcumina, utilizadas de maneira isolada assim como as concentrações de glutatona e N-acetilcisteína, também utilizadas separadamente, apresentaram crescimento similar, em relação ao controle (Figura 7), tendo uma diferença estatisticamente evidente de atividade antifúngica para as concentrações mais altas testadas de curcumina ($1,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,975 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figura 7). O fato deste efeito não ser maior para a curcumina utilizada separadamente aos demais compostos e também o não aparecimento de resultado estatisticamente distinto para a menor concentração de curcumina ($0,475 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (Figuras 7), pode ser devido ao fato da mesma degradar-se em condições de pH neutro ou básico (WANG *et al.*, 1997).

Com a adição da glutatona e da N-acetilcisteína a atividade antifúngica da curcumina apresentou um aumento considerável em relação ao controle positivo de crescimento e também em relação à curcumina isolada, o que demonstra uma possível potencialização do efeito da curcumina quando associada aos antioxidantes.

As concentrações escolhidas para realização do plaqueamento foram as que apresentaram uma visível redução na turvação do meio presente na placa teste, o que caracterizou que houve uma redução no crescimento da cepa, sendo comprovado através do experimento de plaqueamento. Os resultados destas associações estão representados abaixo (Figura 7):

Figura 7: Associação curcumina / N-acetilcisteína (N) e curcumina / glutatona (G) testadas em cepa clínica de *C. parapsilosis*. a) e b) Curcumina 1,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; c) e d) Curcumina 0,975 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; e) e f) Curcumina 0,475 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. N1 e G1 (312,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), N2 e G2 (156,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e N3 e G3 (78,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). *, #, § e £ apresentaram diferença estatística entre si e em relação ao controle ($p < 0,05$).



Outras cepas clínicas testadas nas mesmas condições anteriores foram as *C. tropicalis*, *C. utilis*, *C. parapsilosis* e também uma cepa ATCC de *C. albicans*, a ATCC 14053, as quais não apresentaram atividades aditivas nas associações para todas as concentrações testadas.

6.2. ATIVIDADE ANTIFÚNGICA SOBRE CRYPTOCOCCUS SPP

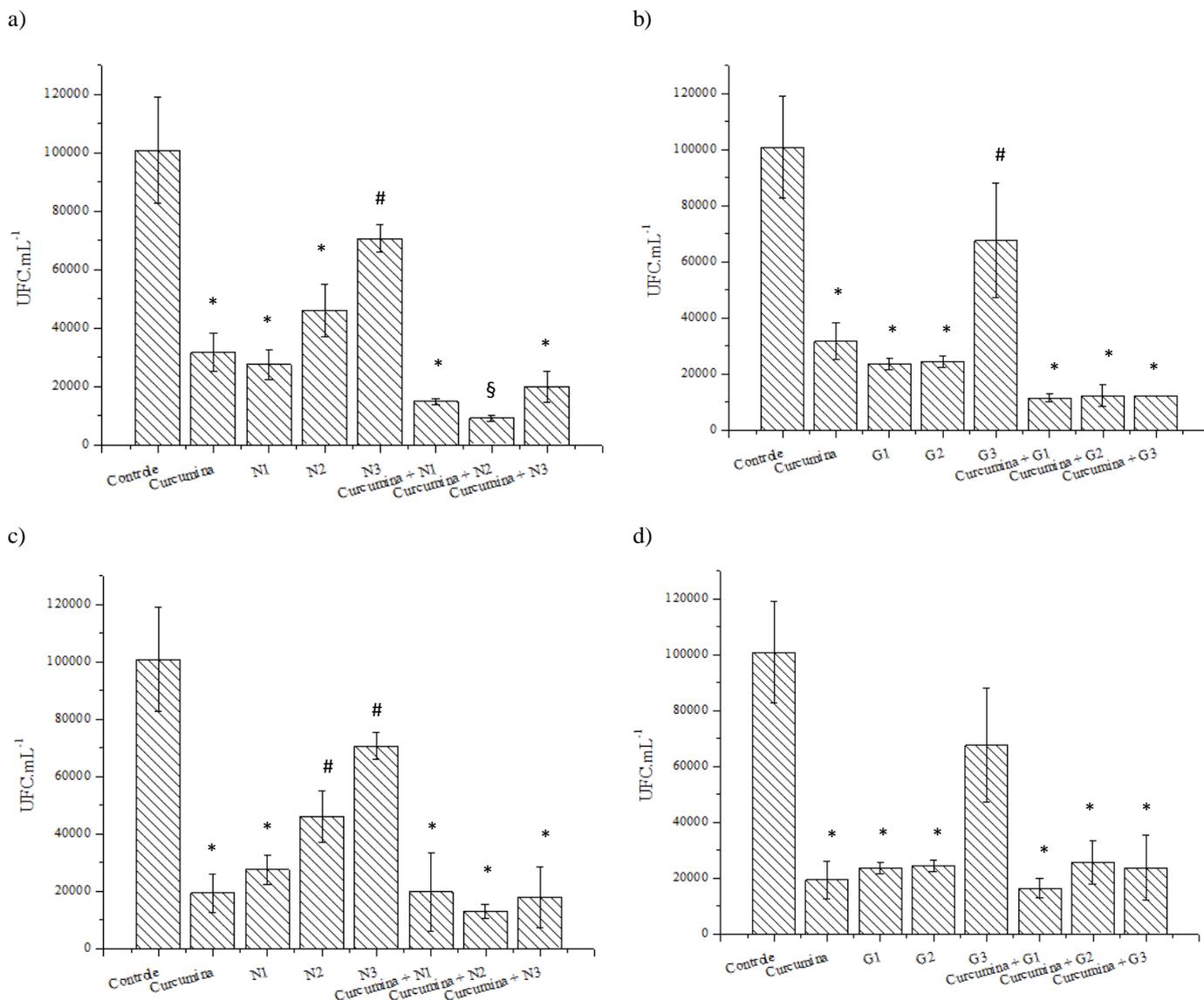
Os ensaios com cepas de *C. neoformans* foram realizados devido à importância deste agente em infecções oportunistas em pacientes com deficiências imunes, enquadrando-se nestes casos portadores de HIV e pessoas que sofreram algum tipo de transplante (LOCKHART *et al.*, 2012). É a causa primária das meningoencefalites em pacientes imunossuprimidos, principalmente os que são HIV positivo (XIE *et al.*, 2012).

A cepa ATCC 90112 de *C. neoformans* apresentou-se sensível às concentrações finais de curcumina (62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). A sensibilidade à curcumina também foi observada em estudo realizado por Martins *et al.* (2009), onde a curcumina foi testada frente diversas cepas, ATCC e clínicas, de várias espécies de fungos, entre os quais, *Candida spp* e *Cryptococcus spp*.

A inibição do crescimento da cepa ATCC de *C. neoformans* pela curcumina (62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) foi de aproximadamente 68%, sendo superior com a adição de N-acetilcisteína e glutatona, passando para 91% e 88% respectivamente; já com a curcumina em menor concentração (31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) a inibição foi de 81%, aumentando para 87% com a N-acetilcisteína e 89% com a glutatona. Estes resultados não foram tão expressivos, pois a curcumina apresentou uma boa resposta quando utilizada de maneira isolada.

Os resultados com o *C. neoformans* estão expressos a seguir (Figura 8):

Figura 8: Associação curcumina / N-acetilcisteína (N) e curcumina / glutatona (G) testadas em cepa ATCC 90112 de *C. neoformans*. a) e b) Curcumina 62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; c) e d) Curcumina 31,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. N1 e G1 (312,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), N2 e G2 (156,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e N3 e G3 (78,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). *, # e § apresentaram diferença estatística entre si e em relação ao controle ($p < 0,05$).



Os ensaios com a cepa clínica de *C. neoformans* foram bastante satisfatórios, pois a redução na quantidade de colônias em comparação com os controles de glutatona, N-acetilcisteína e curcumina foi consideravelmente maior com a adição das substâncias antioxidantes (Tabela 1). Os controles apresentaram uma quantidade elevada de UFC, não sendo possível a contagem das mesmas. Quando adicionadas a N-acetilcisteína e a glutatona, o número de UFC reduziu em grande número, chegando a inibir por completo o crescimento das colônias em duas situações, com as concentrações mais

elevadas de N-acetilcisteína e glutathione (N1 = G1 = 312,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Nas demais concentrações não ocorreu uma inibição completa, mas a redução foi evidente chegando a números bastante reduzidos como por exemplo, $30 \pm 14 \text{ UFC.mL}^{-1}$ para a amostra C2N2. Isto pode ser explicado, da mesma forma que para os ensaios com *Candida spp*, onde as substâncias antioxidantes exerceram efeito redutor na degradação da curcumina em meio com pH neutro, proporcionando desta maneira um maior tempo de ação da substância sobre as cepas. As demais concentrações utilizadas neste ensaio, assim como as já descritas, foram as mesmas do ensaio com a cepa ATCC de *C. neoformans*.

Tabela 1: Resultados para ensaio de atividade antifúngica com cepa clínica de *C. neoformans*. C2 (Curcumina 62,5 µg.mL⁻¹) e C3 (Curcumina 31,25 µg.mL⁻¹); N1 e G1 (312,5 µg.mL⁻¹), N2 e G2 (156,25 µg.mL⁻¹) e N3 e G3 (78,125 µg.mL⁻¹). Resultados expressos com média ± desvio padrão (n = 3).

Amostra	UFC.mL ⁻¹
Controle positivo	Incontáveis
N1, N2 e N3	Incontáveis
G1, G2 e G3	Incontáveis
C2	16.400 ± 11.144
C3	22.600 ± 13.237
C2N1	Não houve crescimento
C2N2	30 ± 14
C2N3	49.680 ± 1.584
C2G1	2.240 ± 1.810
C2G2	53 ± 92
C2G3	5.600 ± 4.073
C3N1	110 ± 155
C3N2	330 ± 14
C3N3	1.860 ± 877
C3G1	Não houve crescimento
C3G2	23.120 ± 18.102
C3G3	5.807 ± 1.361

Ensaio foram realizados em cepas ATCC e clínica de *C. neoformans* utilizando o ácido ascórbico como substância antioxidante, porém, nas concentrações testadas (312,5 µg.mL⁻¹, 156,25 µg.mL⁻¹ e 78,125 µg.mL⁻¹), que foram as mesmas utilizadas para a glutatona e a N-acetilcisteína, o ácido ascórbico não apresentou efeito.

6.3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA CURCUMINA ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO EM CÉLULAS HEP-2

Outra atividade reconhecida da curcumina, a ação sobre linhagens de células tumorais (BASILE *et al.*, 2009; CAI *et al.*, 2012), motivou os ensaios para a determinação desta ação em duas linhagens de células tumorais, sendo elas, células de carcinoma laríngeo humano (HEp-2) e células humanas de tumor retal (HRT-18).

Assim como nos ensaios para determinação da atividade antifúngica, a curcumina foi testada de maneira isolada e com diferentes concentrações de substância antioxidante, neste caso, o ácido ascórbico, composto o qual auxilia na manutenção da estabilidade da curcumina em meio neutro (OETARI *et al.*, 1996).

O tumor de laringe é um dos mais frequentes que ocorre na região de cabeça e pescoço e é predominante entre os homens, representando aproximadamente 25% dos tumores malignos que ocorrem nesta região do corpo e totalizando 2% de todos os tipos de doenças malignas (INCA, 2013). Um grande problema no tratamento deste tipo de câncer é que o mesmo apresenta resistência à ação de várias substâncias, entre elas, vincristina, cisplatina e 5-fluorouracil (YIN *et al.*, 2013).

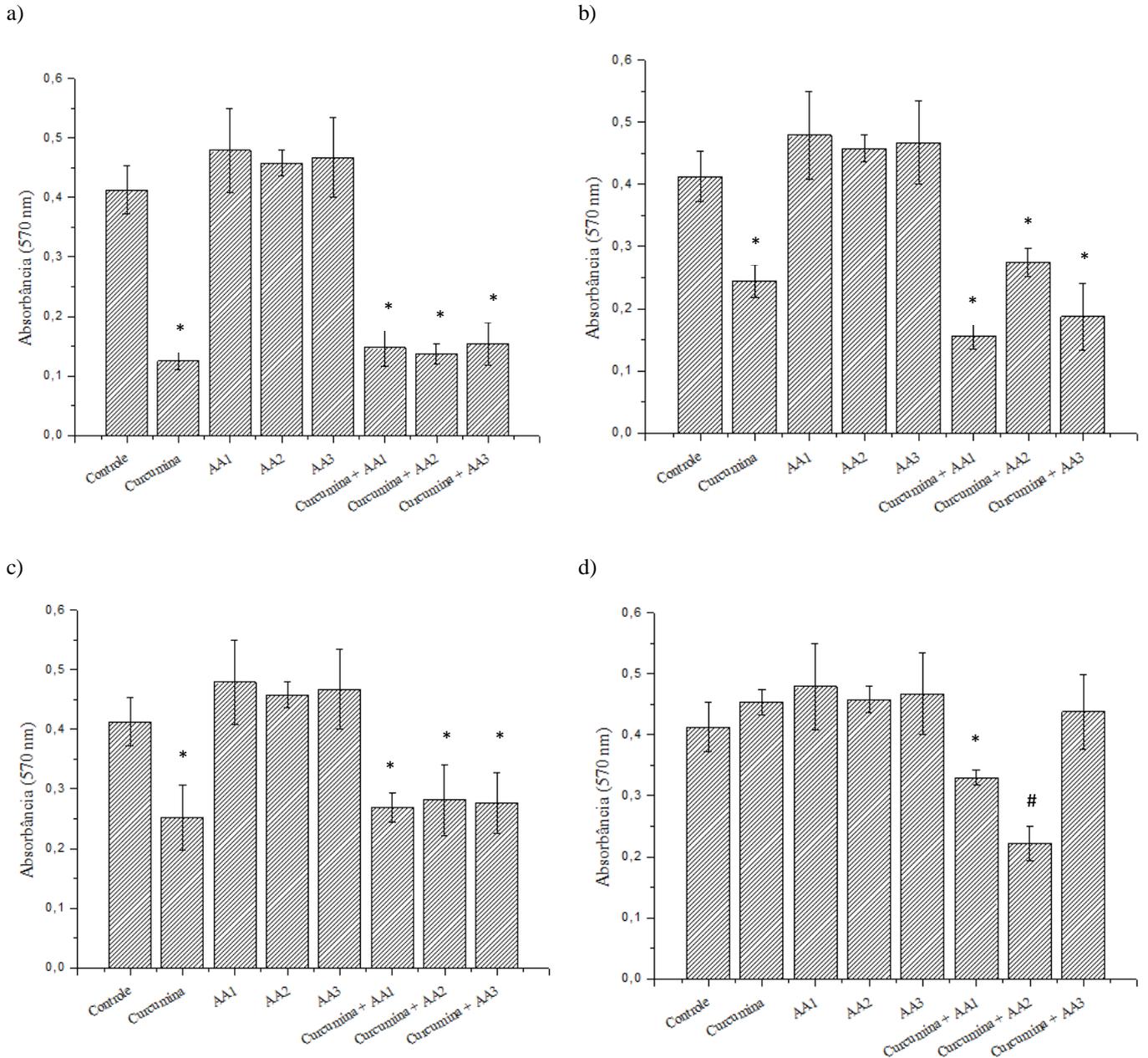
Uma maneira para o desenvolvimento de um tratamento mais específico e eficaz para o carcinoma laríngeo humano é a identificação da expressão gênica associada ao desenvolvimento desta doença. Královcová *et al.* (2008) determinaram a importância da expressão dos genes BCL2 e BAX em células HEP-2 no processo de apoptose, concluindo que existe interferência dos mesmos.

A curcumina, escolhida para o desenvolvimento deste trabalho, possui atividade sobre uma quantidade variada de genes envolvidos no processo de apoptose, entre eles, BCL2 e BAX (WILKEN *et al.*, 2011), antagonizando a proteína anti-apoptótica BCL2 e aumentando a expressão de BAX, com a ativação da proteína p53 (AGGARWAL *et al.*, 2003, ANAND *et al.*, 2008, WILKEN *et al.*, 2011).

Os experimentos utilizando diferentes concentrações de curcumina e ácido ascórbico, para a determinação de uma possível atividade sinérgica entre os compostos, foram realizados nos tempos de 24 e 48 horas, com o objetivo de observar se a presença ou não do ácido ascórbico possui influência sobre a atividade antitumoral da curcumina.

No período de 24 horas foi possível observar que entre as quatro concentrações testadas (40µM, 30 µM, 20 µM e 10 µM), apenas na concentração mais baixa de curcumina em associação com o ácido ascórbico (12,5 µg.mL⁻¹ e 6,25 µg.mL⁻¹), foi observado diferença estatística em relação ao controle utilizado e entre as demais concentrações de ácido ascórbico (Figura 9).

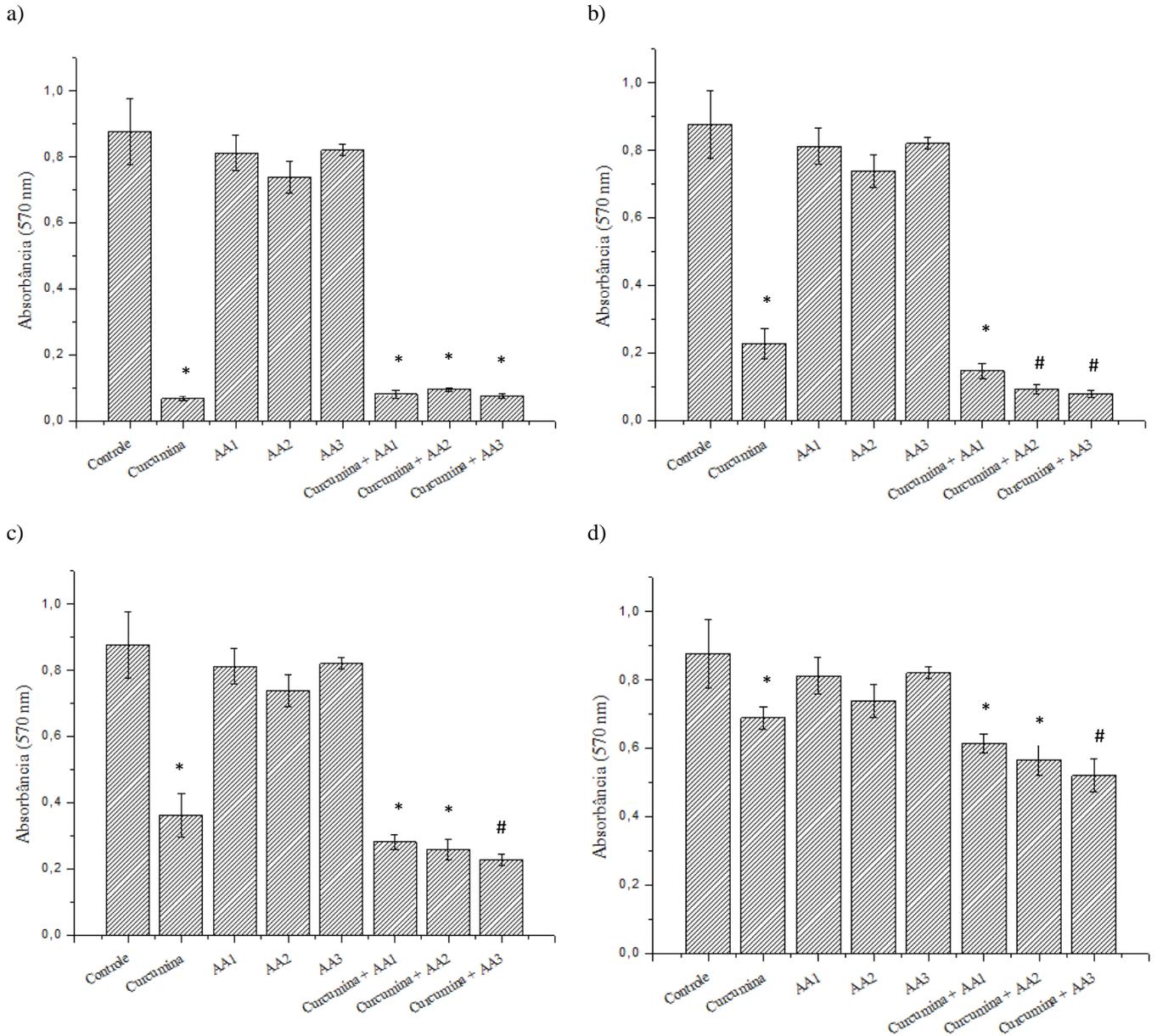
Figura 9: Associação curcumina / ácido ascórbico (AA) testadas em células HEp-2 no período de 24h. a) Curcumina 40 μM ; b) Curcumina 30 μM ; c) Curcumina 20 μM ; d) Curcumina 10 μM . AA1 (12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA2 (6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e AA3 (3,125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). * e # apresentaram diferença estatística entre si e em relação ao controle ($p < 0,05$).



Os resultados obtidos no período de 48 horas demonstraram que as menores concentrações de ácido ascórbico foram mais efetivas na proteção da degradação da curcumina em relação às demais concentrações (Figura 10). Com exceção da maior concentração de curcumina (40 μM) onde a utilização das diferentes concentrações de ácido ascórbico não proporcionou uma diferença estatisticamente significativa em

comparação com o controle, as demais preparações mostraram-se mais estáveis na presença da menor concentração do antioxidante ($3,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$), o que possivelmente está relacionado com um processo de leve acidificação do meio, o que resulta em uma maior estabilidade da curcumina (OETARI *et al.*, 1996).

Figura 10: Associação curcumina / ácido ascórbico (AA) testadas em células HEP-2 no período de 48h. a) Curcumina 40 μM ; b) Curcumina 30 μM ; c) Curcumina 20 μM ; d) Curcumina 10 μM . AA1 (12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA2 (6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e AA3 (3,125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). * e # apresentaram diferença estatística entre si e em relação ao controle ($p < 0,05$).



6.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DA CURCUMINA ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO EM CÉLULAS HRT-18

Os tumores colorretais acontecem tanto no cólon (segmento do intestino grosso) quanto no reto, podendo ter grande possibilidade de cura quando diagnosticados de maneira precoce antes de espalhar-se por outros órgãos (INCA, 2013). Uma característica deste tipo de tumor é uma elevada expressão do gene que regula a COX-2 (DUBOIS & SMALLEY, 1996), sendo que a mesma pode estar mais elevada quando o pH do meio intracelular estiver mais alcalino (PIRKEBNER *et al.*, 2004).

Para o combate da proliferação das células de tumor colorretal, por exemplo, a linhagem de células HRT-18, pode-se recorrer a diversas substâncias com atividade antitumoral conhecida, como o 5-fluorouracil (CRÉHANGE *et al.*, 2011; CONDE *et al.*, 2013) podendo-se associar com oxaliplatina (PUCCIARELLI *et al.*, 2006). Uma alternativa promissora para o tratamento de tumores colorretais é a curcumina, pois além de possuir atividade antitumoral, também age na inibição da expressão do gene regulador da COX-2 (AGGARWAL *et al.*, 2003, ANAND *et al.*, 2008, WILKEN *et al.*, 2011), enzima que está em concentração elevada nestes tipos de tumores (DUBOIS & SMALLEY, 1996).

Uma segunda alternativa é a utilização de ácido ascórbico como adjuvante à atividade antitumoral da curcumina, pois o mesmo, segundo Kim *et al.* (2012) possui a capacidade de induzir apoptose nesta linhagem de células tumorais. Além disso, o ácido ascórbico pode atuar em outras variações do meio onde se encontram as células tumorais, como na redução da expressão gênica da COX-2 (PIRKEBNER *et al.*, 2004).

Os ensaios com as células tumorais HRT-18 foram realizados nos períodos de 24 e 48 horas e os resultados obtidos foram baseados na análise morfológica das células após o tratamento com curcumina e da associação desta com o ácido ascórbico e através da leitura das absorvâncias da cultura de células após tratamento com MTT.

Na análise morfológica das células no período de 24 horas, foi possível observar que as células controle e as células que sofreram a aplicação das diferentes concentrações de curcumina e ácido ascórbico não apresentaram nenhuma diferenciação na morfologia. Foram realizados experimentos controle utilizando-se somente etanol nas células, não sendo observado alteração morfológica nas mesmas.

Os resultados apresentados na tabela 2 demonstraram que a associação da curcumina com o ácido ascórbico provocou alterações morfológicas nas células tumorais, alterações estas não observadas com os compostos isoladamente. Algumas alterações ocorreram de maneira bastante discreta, mas em intensidade suficiente para mostrar diferenças em relação aos controles citados acima.

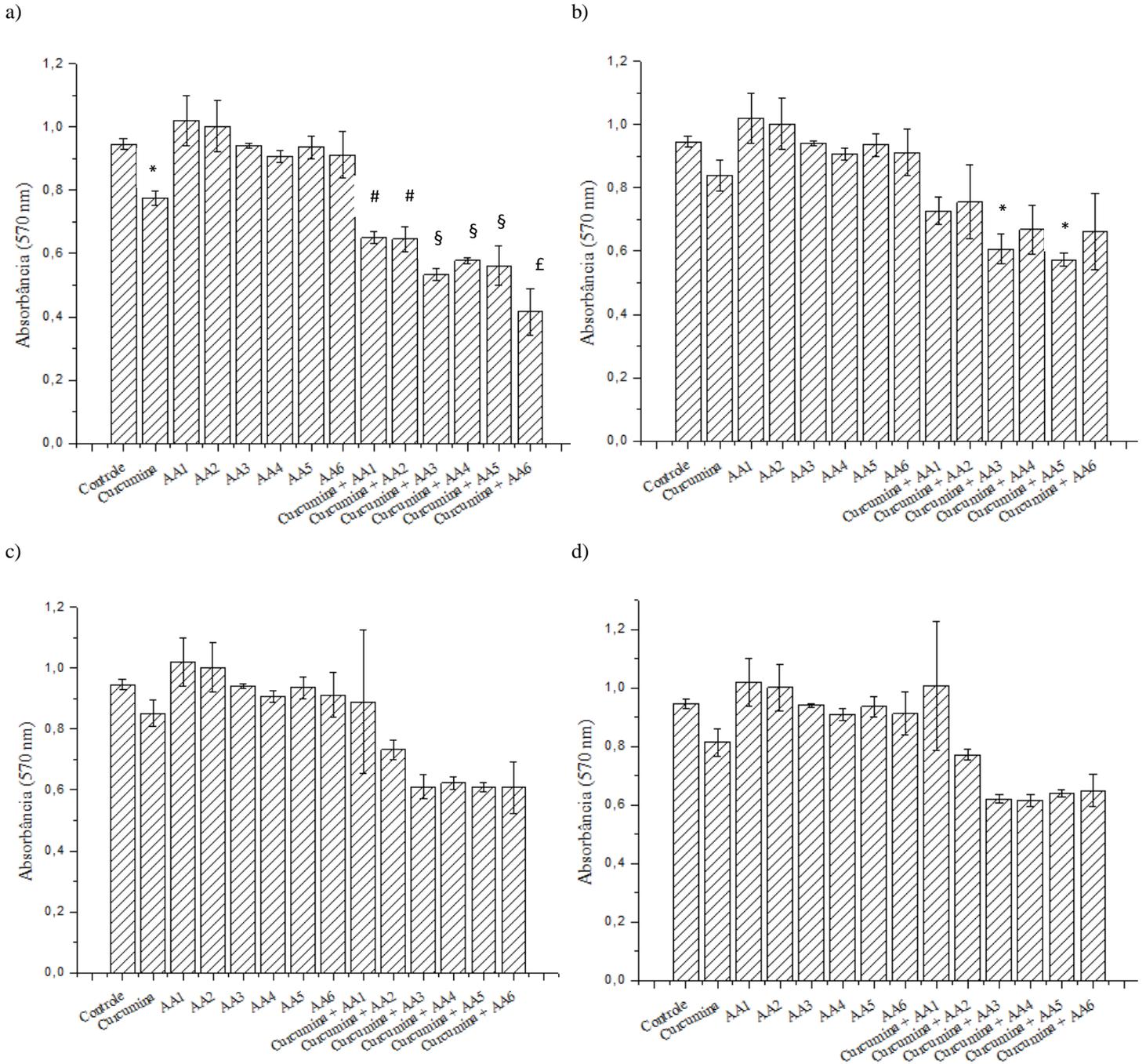
A análise dos resultados obtidos permitiu observar que a associação das duas substâncias provocou alterações morfológicas na maioria das amostras, mesmo que de maneira discreta, com exceção na associação da maior concentração de curcumina (C1 = 30 μM) com a menor concentração de ácido ascórbico (V6 = 0,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (Tabela 2).

Tabela 2: Análise morfológica no ensaio de atividade citotóxica da curcumina (C) em associação ao ácido ascórbico (V) sobre células de linhagem tumoral HRT-18 no período de 24 horas. C1 (30 μM); C2 (20 μM); C3 (15 μM); C4 (10 μM); V1 (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V2 (6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V3 (3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V4 (1,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V5 (0,78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e V6 (0,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Amostra	Análise morfológica
Controle	Normal
Controle etanol	Normal
V1 a V6	Normal
C1 a C4	Normal
V1C1	Vacuolização, arredondamento e retração do citoplasma discretos
V1C2 e V1C3	Vacuolização e arredondamento discretos
V1C4	Sem alterações
V2C1	Vacuolização, arredondamento e retração do citoplasma discretos
V2C2 e V2C4	Normal
V2C3	Vacuolização discreta
V3C1	Vacuolização, arredondamento e retração do citoplasma discretos
V3C2	Vacuolização e arredondamento discretos
V3C3 e V3C4	Vacuolização
V4C1 e V4C2	Vacuolização e arredondamento discretos
V4C3 e V4C4	Vacuolização discreta
V5C1	Vacuolização e arredondamento discretos
V5C2, V5C3 e V5C4	Vacuolização discreta
V6C1	Vacuolização, arredondamento e retração do citoplasma acentuados
V6C2, V6C3 e V6C4	Vacuolização discreta

Como foi possível observar com a leitura dos resultados das medidas das absorvâncias em 570 nm, existiu um provável sinergismo na utilização concomitante do ácido ascórbico com a curcumina (Figura 11).

Figura 11: Associação curcumina / ácido ascórbico (AA) testada em células HRT-18 no período de 24h. a) Curcumina 30 μM ; b) Curcumina 20 μM ; c) Curcumina 15 μM ; d) Curcumina 10 μM . AA1 (12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA2 (6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA3 (3,125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA4 (1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA5 (0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e AA6 (0,39 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). *, #, § e £ apresentaram diferença estatística entre si e em relação ao controle ($p < 0,05$).



Na figura 11 foi possível observar uma ação sinérgica do ácido ascórbico ($3,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$) com a curcumina, apresentando diferença em relação a ação da curcumina utilizada de maneira isolada.

Na análise de 24 horas das ações da curcumina nas concentrações de $15 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$, quando associado o ácido ascórbico não houve uma diferença significativa em relação à ação delas de maneira isolada (Figura 11).

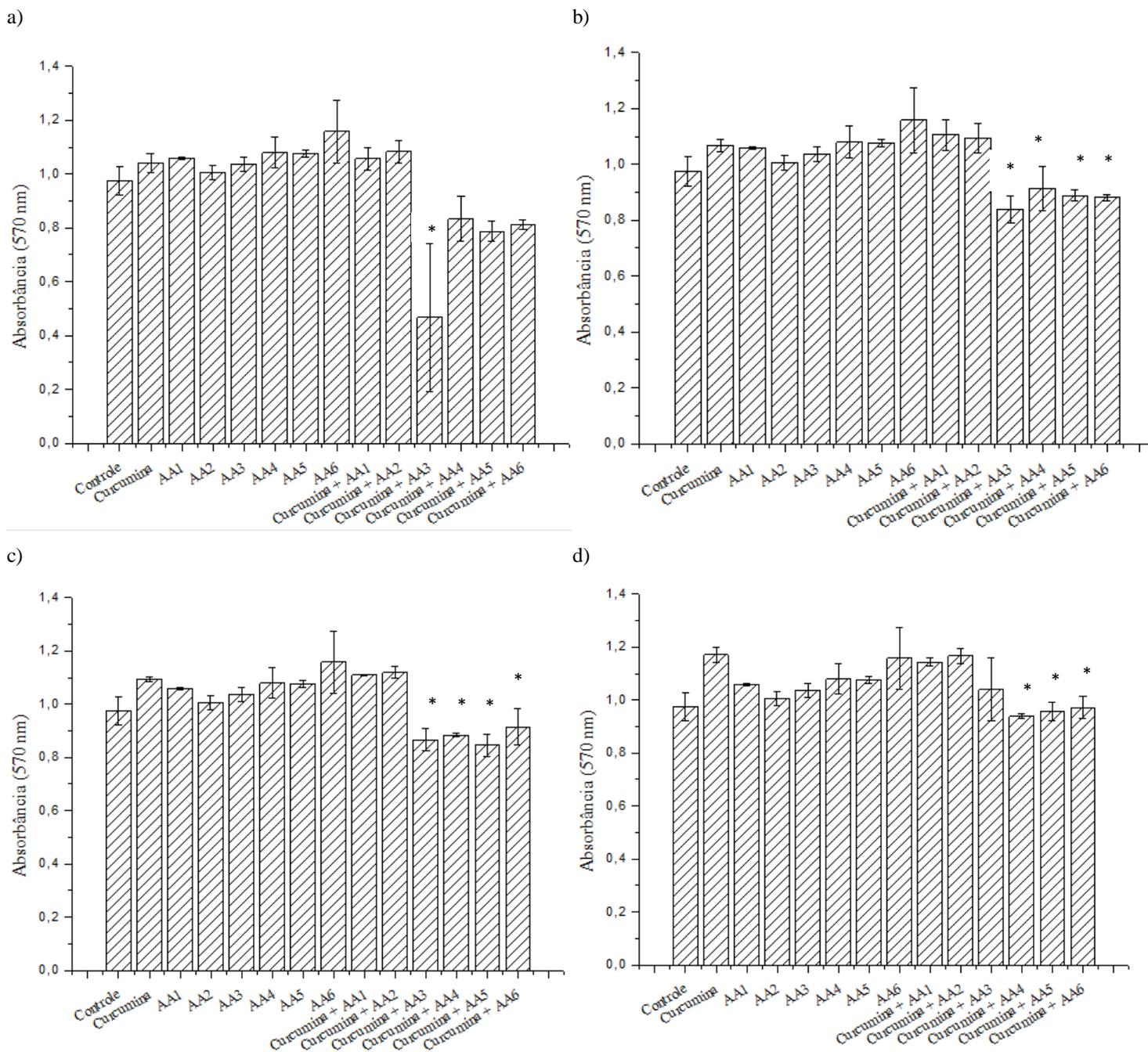
Nas análises morfológicas das células HRT-18 no período de 48 horas (Tabela 3), assim como nas células observadas em 24 horas, os controles e as substâncias utilizadas isoladamente não apresentaram alterações na morfologia. As associações do ácido ascórbico com a curcumina promoveram alterações morfológicas em quase todos os cruzamentos, com exceção de V1C3 e V1C4, ou seja, ácido ascórbico (V1) na concentração de $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e curcumina (C3 e C4) nas concentrações de $15 \mu\text{M}$ e $10 \mu\text{M}$.

A maior alteração morfológica neste período de tempo ocorreu na amostra V3C1, com o ácido ascórbico na concentração de $3,125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (V3) e a curcumina (C1) na de ($40 \mu\text{M}$), o que pôde ser observado com a leitura da absorbância em 570 nm , demonstrando que houve uma maior morte celular nesta associação (Figura 12).

Tabela 3: Análise morfológica no ensaio de atividade citotóxica da curcumina (C) em associação ao ácido ascórbico (V) sobre células de linhagem tumoral HRT-18 no período de 48 horas. C1 (30 μM); C2 (20 μM); C3 (15 μM); C4 (10 μM); V1 (12,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V2 (6,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V3 (3,125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V4 (1,56 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), V5 (0,78 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e V6 (0,39 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

Amostra	Análise morfológica
Controle	Normal
Controle etanol	Normal
V1 a V6	Normal
C1 a C4	Normal
V1C1 e V1C2	Vacuolização discreta
V1C3 e V1C4	Normal
V2C1, V2C2, V2C3 e V2C4	Vacuolização discreta
V3C1	Arredondamento, retração do citoplasma e debri celular
V3C2, V3C3 e V3C4	Vacuolização discreta
V4C1	Vacuolização e arredondamento discretos
V4C2, V4C3 e V4C4	Vacuolização
V5C1, V5C2 e V5C3	Vacuolização e arredondamento discreto
V5C4	Vacuolização
V6C1 e V6C2	Vacuolização, arredondamento discreto
V6C3 e V6C4	Vacuolização

Figura 12: Associação curcumina / ácido ascórbico (AA) testada em células HRT-18 no período de 48h. a) Curcumina 30 μM ; b) Curcumina 20 μM ; c) Curcumina 15 μM ; d) Curcumina 10 μM . AA1 (12,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA2 (6,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA3 (3,125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA4 (1,56 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), AA5 (0,78 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e AA6 (0,39 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). * apresentou diferença estatística em relação ao controle ($p < 0,05$).



Na figura 12 b-c observa-se que as quatro menores concentrações de ácido ascórbico auxiliaram de maneira mais efetiva a ação da curcumina, seja pela proteção da degradação da mesma em meio fisiológico (OETARI *et al.*, 1996), seja pela possível ação no favorecimento da apoptose das células tumorais (KIM *et al.*, 2012).

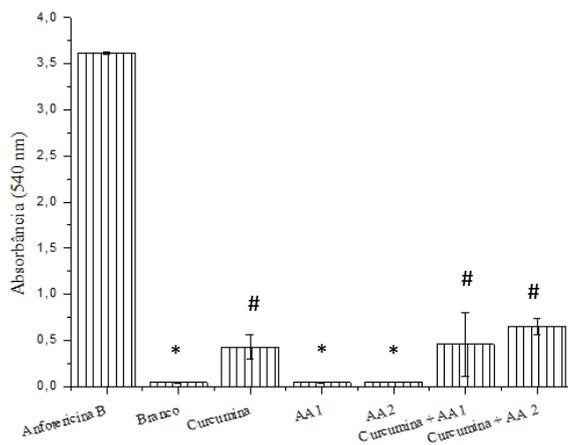
Já na figura 12 d, observou-se que apenas as três últimas concentrações de ácido ascórbico apresentaram atividade de um possível sinergismo com a curcumina, seguindo o padrão das ações do uso concomitante das substâncias nas demais concentrações.

6.5. AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE SOBRE ERITRÓCITOS

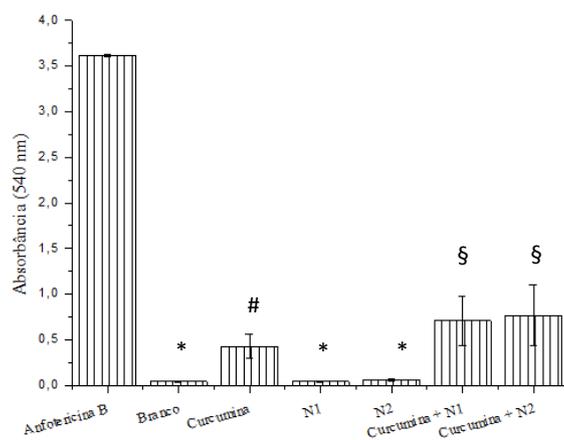
Os ensaios para esta determinação foram realizados com a curcumina, ácido ascórbico, glutatona e N-acetilcisteína de maneira isolada e também realizando a associação dos três últimos compostos com a curcumina. As concentrações utilizadas foram: $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para a curcumina e $0,312 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,156 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para o ácido ascórbico, glutatona e N-acetilcisteína. Os resultados obtidos demonstraram que tanto a utilização da curcumina isolada quanto em associação com os antioxidantes apresentou quantidade muito pequena de hemólise (Figura 13) em comparação com a anfotericina B, na concentração de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$, utilizada como padrão positivo de hemólise. Este resultado demonstra que a associação da curcumina com os antioxidantes não apresenta, em eritrócitos, efeitos deletérios.

Figura 13: a) Teste de hemólise curcumina ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ácido ascórbico (AA1 e AA2) ($0,312 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,156 \mu\text{g.mL}^{-1}$); b) Teste de hemólise curcumina ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e N-acetilcisteína (N1 e N2) ($0,312 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,156 \mu\text{g.mL}^{-1}$); c) Teste de hemólise curcumina ($62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e glutationa (G1 e G2) ($0,312 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $0,156 \mu\text{g.mL}^{-1}$). *, # e § apresentaram diferença estatística entre si e em relação à anfotericina B ($p < 0,05$).

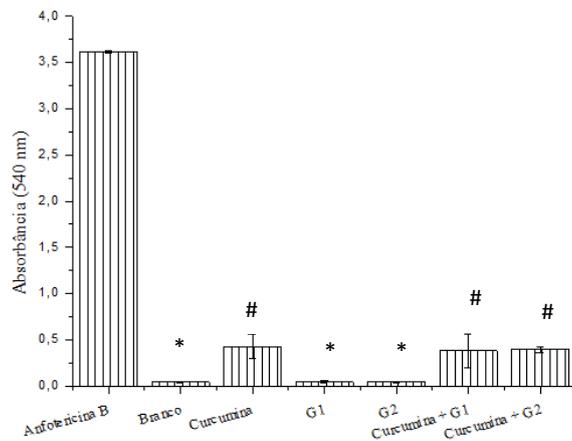
a)



b)



c)



6.6. TESTE DE ESTABILIDADE DA CURCUMINA

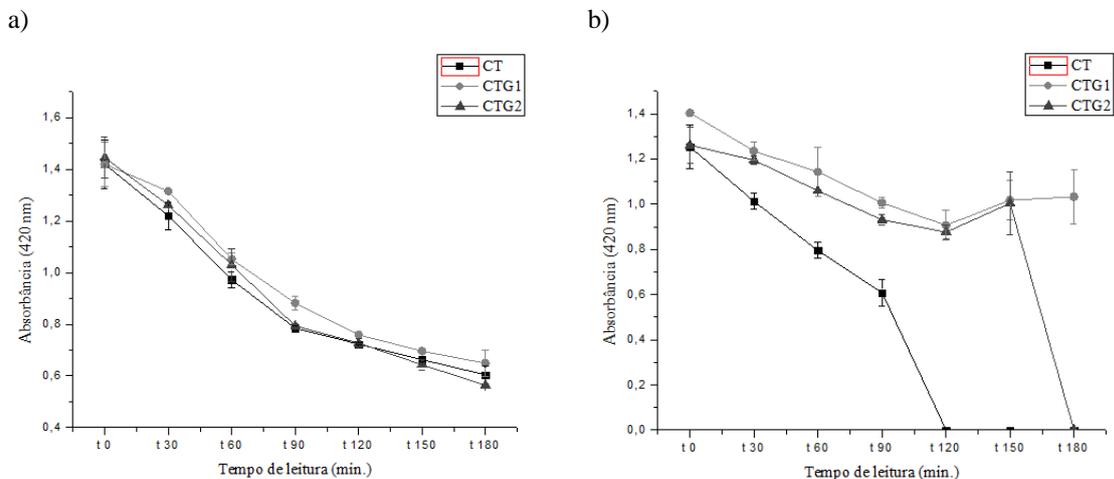
Os ensaios para determinação da estabilidade da curcumina dissolvida em tampão fisiológico (pH 7,4), foram realizados através de leituras espectrofotométricas das soluções de curcumina isolada ou em associação com a glutatona, N-acetilcisteína ou ácido ascórbico.

Este experimento foi motivado, pois diversos estudos indicam que a curcumina associada à terapia fotodinâmica exerce um maior efeito no combate à *C. albicans* (ALVES, 2011).

O presente trabalho indicou que a curcumina associada a outras substâncias antioxidantes, como N-acetilcisteína e glutatona, também apresentou resultados satisfatórios na ação contra cepa clínica de *C. parapsilosis* e cepas ATCC e clínica de *C. neoformans*.

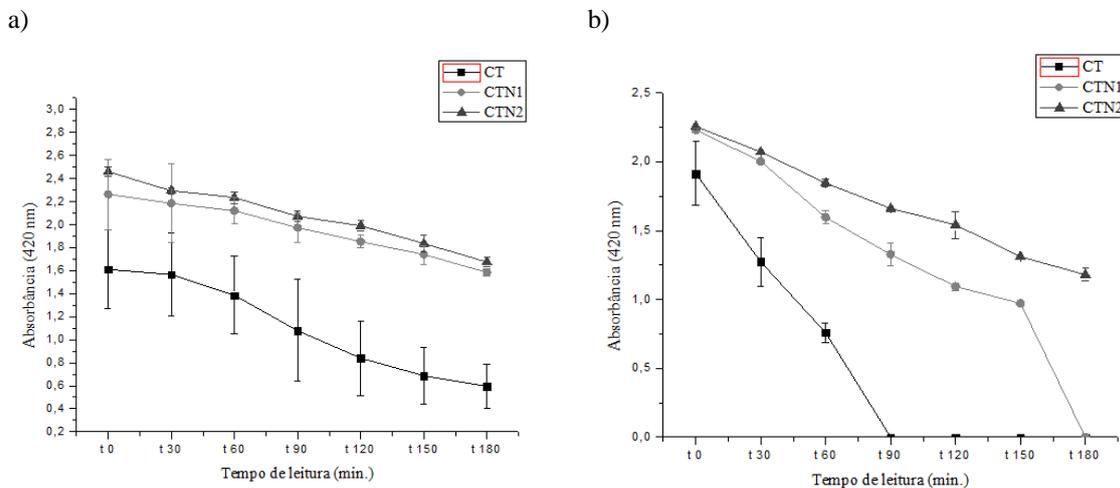
Os resultados obtidos demonstraram que a aplicação do LED, por 180 minutos, promoveu uma degradação mais acelerada da curcumina. Na figura 14 observa-se a curcumina isolada e a sua associação com a glutatona, demonstrando que com a aplicação do LED a curcumina em 120 minutos estava totalmente degradada e a glutatona reduziu quantidade de curcumina degradada nas demais soluções. Comparando-se com os resultados desta mesma associação, mas sem a aplicação do LED, observa-se que as soluções apresentaram um comportamento muito semelhante durante todos os tempos de leitura das amostras, tendo uma degradação gradual com o passar do tempo. Portanto, a utilização da glutatona foi vantajosa quando o LED foi aplicado (Figura 14).

Figura 14: a) Teste de estabilidade curcumina (C) ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e glutationa (G1 e G2) ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão fisiológico (pH 7,4) com tempo máximo de leitura em 180 min. b) Teste de estabilidade curcumina (C) ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e glutationa (G1 e G2) ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão fisiológico (pH 7,4) aplicando LED com tempo máximo de leitura em 180 min.



No ensaio com a N-acetilcisteína observou-se uma redução na degradação da curcumina, tanto na ausência do LED quanto na presença (Figura 15), confirmando que a simples presença da solução de curcumina em meio fisiológico já é o suficiente para a sua degradação como demonstrou Niu *et al.* (2012). A degradação da curcumina foi muito acentuada na presença de LED, sendo que em 90 min. a curcumina estava completamente degradada. As soluções contendo N-acetilcisteína nas concentrações de $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$ permitiram uma menor degradação da curcumina diluída em solução fisiológica. Observa-se que a utilização da N-acetilcisteína promoveu esta melhora desde a primeira leitura, em ambas as situações.

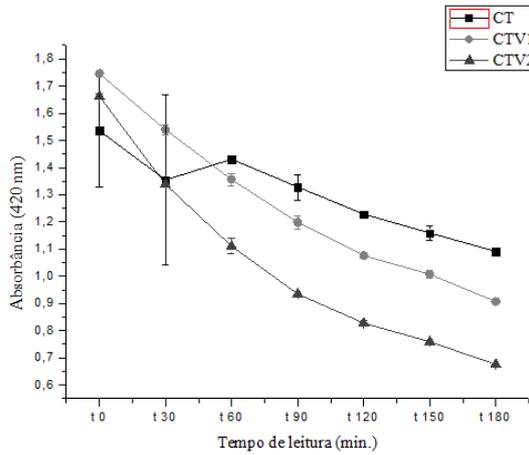
Figura 15: a) Teste de estabilidade curcumina (C) ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e N-acetilcisteína (N1 e N2) ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão fisiológico (pH 7,4) com tempo máximo de leitura em 180 min. b) Teste de estabilidade curcumina (C) ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e N-acetilcisteína (N1 e N2) ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão fisiológico (pH 7,4) aplicando LED com tempo máximo de leitura em 180 min.



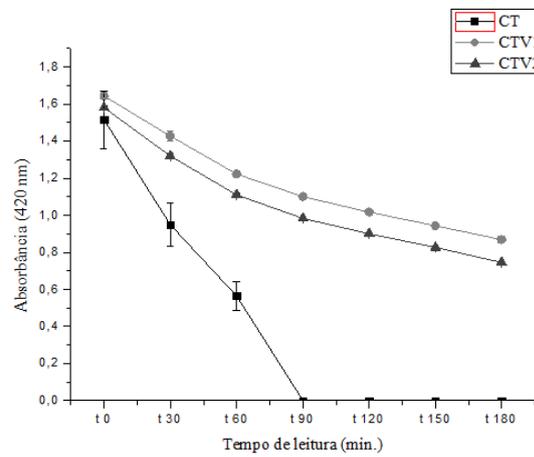
Os experimentos para avaliar a estabilidade da curcumina diluída em meio fisiológico, utilizando o ácido ascórbico associado, demonstrou que este composto reduz consideravelmente a degradação da curcumina, principalmente quando ocorreu a aplicação do LED (Figura 16). Foi possível observar que a degradação da solução contendo apenas a curcumina foi inferior à degradação das soluções da associação sem a utilização do LED, porém, quando houve a aplicação do LED, a degradação da curcumina foi acentuadamente reduzida, pois, sem o antioxidante, em 90 minutos não foi possível observar mais a presença da curcumina na leitura espectrofotométrica, já com a utilização do ácido ascórbico, a leitura foi bastante satisfatória até o tempo de 180 minutos, demonstrando que a degradação da curcumina foi reduzida consideravelmente (Figura 16).

Figura 16: a) Teste de estabilidade curcumina (C) ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ácido ascórbico (V1 e V2) ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão fisiológico (pH 7,4) com tempo máximo de leitura em 180 min. b) Teste de estabilidade curcumina (C) ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e ácido ascórbico (V1 e V2) ($200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $400 \mu\text{g.mL}^{-1}$) em tampão fisiológico (pH 7,4) aplicando LED com tempo máximo de leitura em 180 min.

a)



b)



7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os experimentos realizados com a curcumina para a determinação de um possível aumento na atividade antifúngica e antitumoral, associada à adição de antioxidantes, neste caso glutathiona, N-acetilcisteína e ácido ascórbico, demonstraram que esta associação de compostos exerce efeito aditivo nas referidas atividades da curcumina.

Nos ensaios que avaliaram estas associações na determinação da atividade antifúngica, foram escolhidos os antioxidantes glutathiona e N-acetilcisteína pelo fato de estudos comprovarem que estes compostos exercem um efeito protetor contra a degradação da curcumina em meio fisiológico (OETARI *et al.*, 1996). A associação de antioxidantes sobre o efeito antifúngico da curcumina já foi demonstrada com a adição do ácido ascórbico (KHALIL *et al.*, 2012). Neste trabalho, de estudo do efeito de antioxidantes sobre a atividade antifúngica e citotóxica da curcumina, foi observado que a adição dos antioxidantes melhorou consideravelmente a atividade antifúngica da curcumina reduzindo significativamente o crescimento de colônias de uma cepa clínica de *C. parapsilosis*, demonstrando um possível sinergismo na ação dos compostos. Testes também foram realizados com uma cepa clínica e uma cepa ATCC de *C. neoformans* mostrando que a curcumina exerce um efeito antifúngico sobre estas cepas, efeito menos acentuado em relação à cepa de *C. parapsilosis*, mas promissor.

A atividade citotóxica da curcumina também foi avaliada neste trabalho utilizando duas linhagens de células tumorais, a HEP-2 e a HRT-18. O ácido ascórbico foi utilizado nestes experimentos por apresentar efeito protetor contra a degradação da curcumina, assim como a glutathiona e a N-acetilcisteína (OETARI *et al.*, 1996) além de também atuar na acidificação do meio, situação que garante maior tempo de estabilidade da curcumina devido a mesma degradar-se facilmente em meio neutro a básico (WANG *et al.*, 1997). A utilização da curcumina em associação ao ácido ascórbico mostrou que a atividade antitumoral foi ampliada em ambas as linhagens de células tumorais, quando comparada à curcumina isolada. Outro aspecto importante na utilização do ácido ascórbico, é que as células HRT-18 possuem uma sensibilidade maior a este antioxidante, o qual pode induzir a apoptose nas mesmas (KIM *et al.*, 2012).

A associação da curcumina aos antioxidantes foi testada em células normais (hemácias) para verificar se estes compostos utilizados juntos não exerciam efeito

citotóxico. Os resultados foram satisfatórios, pois demonstraram que a associação não oferece risco para estas células, independente do composto utilizado com a curcumina, entre os quais, glutathione, N-acetilcisteína ou ácido ascórbico.

Outro importante experimento realizado foi o que ajudou a determinar que a presença das substâncias antioxidantes em meio fisiológico ajudam na manutenção da estabilidade da curcumina por um período maior de tempo em relação à utilização da mesma de maneira isolada no meio. A utilização de LED, que pode acelerar a degradação da curcumina, ajudou na identificação da ação dos antioxidantes que atuaram como protetores da curcumina, permitindo que esta continuasse presente no meio fisiológico por um período de até 180 minutos.

8. CONCLUSÕES

1. Os resultados encontrados com os ensaios para a determinação da atividade antifúngica frente a cepas clínicas e ATCC de *Candida spp* e cepas clínica e ATCC de *C. neoformans* foram bastante satisfatórios, pois demonstraram um relevante aumento no efeito antifúngico da curcumina quando associada às substâncias antioxidantes glutatona e a N-acetilcisteína.
2. Os ensaios com as linhagens de células tumorais HEP-2 e HRT-18 permitiram concluir que o ácido ascórbico, possivelmente, protege a curcumina em meio com pH neutro, exercendo provável atividade complementar nesta associação.
3. Além das conclusões descritas acima, a glutatona, a N-acetilcisteína e o ácido ascórbico demonstraram um possível efeito protetor contra a degradação da curcumina em meio fisiológico (pH 7,4) e também na aplicação de LED nestas soluções, garantindo assim um maior tempo de ação da curcumina.
4. Estudos complementares são necessários, mas os resultados encontrados demonstram um promissor caminho para o entendimento da melhor utilização da curcumina como substância antifúngica e citotóxica e a sua utilização associada aos antioxidantes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B.; HARIKUMAR, K. B. Potential Therapeutic Effects of Curcumin, the Anti-inflammatory Agent, Against Neurodegenerative, Cardiovascular, Pulmonary, Metabolic, Autoimmune and Neoplastic Diseases. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 41 (1), p. 40-59, 2009.

AGGARWAL, B.B.; KUMAR, A.; BHARTI, A. C. Anticancer Potencial of Curcumin: Preclinical and Clinical Studies. *Anticancer Reaserch*, v. 23, p. 363-398, 2003.

AGUADO, J. M.; RUIZ-CAMPS, I.; MUÑOZ, P.; MENSA, J.; ALMIRANTE, B.; VÁZQUEZ, L.; ROVIRA, M.; MARTÍN-DÁVILA, P.; MORENO, A.; ÁLVAREZ-LERMA, F.; LEÓN, C.; MADERO, L.; RUIZ-CONTRERAS, J.; FORTÚN, J.; CUENCA-ESTRELLA, M. Grupo de Estudio de Micología Médica de la SEIMC (GEMICOMED). Recomendaciones sobre el tratamiento de la candidiasis invasiva y otras infecciones por levaduras de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC). Actualización 2011. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 29 (5), p. 345-361, 2011.

ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e Agentes Antineoplásicos Ciclo-Celular Específicos e Ciclo-Celular Não Específicos que Interagem com o Dna: Uma Introdução. *Química Nova*, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.

ALVES, O. A. *Avaliação da eficiência do diodo emissor de luz (LED) emitindo em 460 nm associado à curcumina na fotossensibilização letal de Candida albicans e de Aggregatibacter actinomycetemcomitans. Estudo in vitro*. 2011. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Engenharia Mecânica) – Escola de Engenharia, Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Belo Horizonte – MG.

ANAND, P.; KUNNUMAKKARA, A. B.; NEWMAN, R. A.; AGGARWAL, B. B. Bioavailability of Curcumin: Problems and Promises. *Molecular Pharmaceutics*, v. 4, No. 6, p. 807-818, 2007.

ANAND, P.; SUNDARAM, C.; JHURANI, S.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin and cancer: An “old-age” disease with an “age-old” solution. *Cancer Letters*, v. 267, p. 133-164, 2008.

ARAÚJO, C. A. C.; LEON, L. L. Biological activities of *Curcuma longa* L. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 96, n. 5, p. 723-728, 2001.

BARGAGLI, E.; OLIVIERI, C.; BENNETT, D.; PRASSE, A.; MULLER-QUERNHEIM, J.; ROTTOLI, P. Oxidative stress in the pathogenesis in diffuse lung diseases: A review. *Respiratory Medicine*, v. 103, p. 1245-1256, 2009.

BASILE, V.; FERRARI, E.; LAZZARI, S.; BELLUTI, S.; PIGNEDOLI, F.; IMBRIANO, C. Curcumin derivatives: Molecular basis of their anti-cancer activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 78, p. 1305-1315, 2009.

BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R.; KARIKARI, C.; MAITRA, A.; MAITRA, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (nanocurcumin): a novel strategy for human cancer therapy. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 5, No. 3, 2007.

BOVERS, M.; HAGEN, F.; BOEKHOUT, T. Diversity of the *Cryptococcus neoformans*-*Cryptococcus gattii* species complex. *Revista Iberoamericana de Micología*, v. 25, p. S4-S12, 2008.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **O que é o câncer?** Disponível em: http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em 19 de maio de 2011.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer (INCA). **Tipos de câncer.** Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>. Acesso em 01 de agosto de 2013.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodmann & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 2006.

CAI, W.; ZHANG, B.; DUAN, D.; WU, J.; FANG, J. Curcumin targeting the thioredoxin system elevates oxidative stress in HeLa cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 262, p. 341-348, 2012.

CERVERA, C. Candidemia y candidiasis invasora en el adulto. Formas clínicas y tratamiento. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, v. 30 (8), p. 483-491, 2012.

CLSI M27-A2, Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – Segunda Edição, Vol. 22, No. 15, 2002. Substitui a norma M27-A, Vol. 17, No. 9.

CONDE, S.; BORREGO, M.; TEIXEIRA, T.; TEIXEIRA, R.; SÁ, A.; SOARES, P. Neoadjuvant oral vs. infusional chemoradiotherapy on locally advanced rectal cancer: Prognostic factors. *Reports of Practical Oncology and Radiotherapy*, v. 18, p. 67-75, 2013.

CRÉHANGE, G.; BOSSET, J. F.; MAINGON, P. Chimioradiothérapie préopératoire des cancers du rectum: ce que laissent presage les études en cours et à venir. *Cancer/Radiothérapie*, v. 15, p. 440-444, 2011.

CUI, J.; YU, B.; ZHAO, Y.; ZHU, W.; LI, H.; LOU, H.; ZHAI, G. Enhancement of oral absorption of curcumin by self-microemulsifying drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 371, p. 148-155, 2009.

DEAN, O.; GIORLANDO, F.; BERK, M. N-acetylcysteine in psychiatry: current therapeutic evidence and potential mechanisms of action. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, v. 36 (2), p. 78-86, 2011.

DENG, S. L.; CHEN, W. F.; ZHOU, B.; YANG, L.; LIU, Z. L. Protective effects of curcumin and its analogues against free radical-induced oxidative haemolysis of human red blood cells. *Food Chemistry*, v. 98, p. 112-119, 2006.

DUBOIS, R. N.; SMALLEY, W. E. Cyclooxygenase, NSAIDs, and colorectal cancer. *Journal of Gastroenterology*, v. 31, p. 898-906, 1996.

ESPADA, R.; VALDESPINA, S.; ALFONSO, C.; RIVAS, G.; BALLESTEROS, M. P.; TORRADO, J. J. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 361, p. 64-69, 2008.

FIGUERAS, C.; HEREDIA, C. D.; GARCÍA, J. J.; NAVARRO, M.; Ruiz-CONTRERAS, J.; ROSSICH, R.; RUMBAO, J.; FRICK, M. A.; ROSELLÓ, E. M. en representación del grupo de estudio de la Infección Fúngica Invasiva de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica (SEIP). Recomendaciones de la Sociedad Española de Infectología Pediátrica sobre diagnóstico y tratamiento de la candidiasis invasiva. *Anales de Pediatría*, v. 74 (5), p. 337.e1-337.e17, 2011.

FIORILLO, C.; BECATTI, M.; PENSALFINI, A.; CECCHI, C.; LANZILAO, L.; DONZELLI, G.; NASSI, N.; GIANNINI, L.; BORCHI, E.; NASSI, P. Curcumin protects cardiac cells against ischemia-reperfusion injury: effects on oxidative stress, NF- κ B, and JNK pathways. *Free Radical Biology & Medicine*, v. 45, p.839–846, 2008.

FRANCO, R.; SÁNCHEZ-OLEA, R.; REYES-REYES, E. M.; PANAYIOTIDIS, M. I. Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis: Ménage à Trois. *Mutation Research*, v. 674, p. 3–22, 2009.

GHANTA, S.; CHATTOPADHYAY, S. Glutathione as a signaling molecule another challenge to pathogens. *Plant Signaling & Behavior*, v. 6:6, p. 783-788, 2011.

GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. *Biochemical Pharmacology*, v. 75, p. 787-809, 2008.

HEATH, D. D.; PRUITT, M. A.; BRENNER, D. E.; ROCK, C. L. Curcumin in plasma and urine: quantitation by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, v. 783, p. 287-295, 2003.

HONG, W. S.; JUNG, H. Y.; YANG, S. K.; MYUNG, S. J.; KIM, J. H.; MIN, Y. I.; CHUNG, M. H.; LEE, H. S.; KIM, H. W. The antioxidant effect of rebamipide on oxygen free radical production by H. pylori-activated human neutrophils: in comparison with n-acetylcysteine, ascorbic acid and glutathione. *Pharmacological Research*, v. 44, n. 4, p. 293-297, 2001.

HOPPS, E.; NOTO, D.; CAIMI, G.; AVERNA, M. R. A novel component of the metabolic syndrome: The oxidative stress. *Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases*, v. 20, p. 72-77, 2010.

IBRAHIM, A.; EL-MELIGY, A.; LUNGU, G.; FETAH, H.; DESSOUKI, A.; STOICA, G.; BARHOUMI, R. Curcumin induces apoptosis in a murine mammary gland adenocarcinoma cell line through the mitochondrial pathway. *European Journal of Pharmacology*, v. 668, p. 127–132, 2011.

JIANHUA, W.; HAI, W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. *Journal of Medical Colleges of PLA*, v. 24, p. 142–147, 2009.

JOZEF CZAK, M.; REMANS, T.; VANGRONSVELD, J.; CUYPERS, A. Glutathione Is a Key Player in Metal-Induced Oxidative Stress Defenses. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 13, p. 3145-3175, 2012.

KARAMAN, M.; AYYILDIZ, Z. A.; FIRINCI, F.; KIRAY, M.; BAGRIYANIK, A.; YILMAZ, O.; UZUNER, N.; KARAMAN, Ö. Effects of Curcumin on Lung Histopathology and Fungal Burden in a Mouse Model of Chronic Asthma and Oropharyngeal Candidiasis. *Archives of Medical Research*, v. 42, p. 79-87, 2011.

KHALIL, O. A. K.; OLIVEIRA, O. M. M. F.; VELLOSA, J. C. R.; QUADROS, A. U.; DALPOSSO, L. M.; KARAM, T. K.; MAINARDES, R.M.; KHALIL, N. M. Curcumin antifungal and antioxidant activities are increased in the presence of ascorbic acid. *Food Chemistry*, v. 133, p. 1001–1005, 2012.

KHAN, N.; SHREAZ, S.; BHATIA, R.; AHMAD, S. I.; MURALIDHAR, S.; MANZOOR, N.; KHAN, L. A. Anticandidal activity of curcumin and methyl cinnamaldehyde. *Fitoterapia*, v. 83, p. 434–440, 2012.

KHERADPEZHOUH, E.; PANJEHSHAHIN, M. R.; MIRI, R.; JAVIDNIA, K.; NOORAFSHAN, A.; MONABATI, A.; DEHPOUR, A. R. Curcumin protects rats against acetaminophen-induced hepatorenal damages and shows synergistic activity with N-acetyl cysteine. *European Journal of Pharmacology*, v. 628, p. 274–281, 2010.

KIM, J. E.; KANG, J. S.; LEE, W, J. Vitamin C induces apoptosis in human colon cancer cell line, HCT-8 via the modulation of calcium influx in endoplasmic reticulum and the dissociation of Bad from 14-3-3 β . *Immune Network*, v. 12, n. 5, p. 189-195, 2012.

KÖSTEL, A. S.; BORA-TATAR, G.; ERDEM-YURTER, H. Spinal muscular atrophy: An oxidative stress response counteracted with curcumin. *Biomedicine & Aging Pathology*, v. 2, p. 61–66, 2012.

KRÁLOVCOVÁ, D.; PEJCHALOVÁ, M.; RUDOLF, E.; ČERVINKA, M. Quantitative analysis of expression level of Bcl2 and Bax genes in HEP-2 and HL-60 cells after treatment with etoposide. *Acta Medica*, v. 51, n. 3, p. 191-195, 2008.

KUNNUMAKKARA, A. B.; ANAND, P.; AGGARWAL, B. B. Curcumin inhibits proliferation, invasion, angiogenesis and metastasis of different cancers through interaction with multiple cell signaling proteins. *Cancer Letters*, v. 269, p. 199–225, 2008.

KUNWAR, A.; BARIK, A.; MISHRA, B.; RATHINASAMY, K.; PANDEY, R.; PRIYADARSINI, K. I. Quantitative cellular uptake, localization and cytotoxicity of curcumin in normal and tumor cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1780, p. 673–679, 2008.

LI, X.; FRANKE, A. A. Fast HPLC–ECD analysis of ascorbic acid, dehydroascorbic acid and uric acid. *Journal of Chromatography B*, v. 877, p. 853-856, 2009.

LOCKHART, S. R.; IQBAL, N.; BOLDEN, C. B.; DEBESS, E. E.; MARSDEN-HAUG, N.; WORHLE, R.; THAKUR, R.; HARRIS, J. R. for the Cryptococcus gattii PNW Public Health Working Group. Epidemiologic cutoff values for triazole drugs in Cryptococcus gattii: correlation of molecular type and in vitro susceptibility. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, p. 144–148, 2012.

MARCZYLO, T. H.; VERSCHOYLE, R. D.; COOKE, D. N.; MARAZZONI, P.; STEWARD, W. P.; GESCHER, A. J. Comparison of systemic availability of curcumin with that of curcumin formulated with phosphatidylcholine. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 60, p. 171-177, 2007.

MARTINS, C. V. B.; SILVA, D. L.; NERES, A. T. M.; MAGALHÃES, T. F. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V.; SABINO, A. A.; FÁTIMA, A.; RESENDE, M. A. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 63, p. 337–339, 2009.

MEISTER, A. Metabolism and functions of glutathione. *Trends in Biochemical Sciences*, v. 6, p. 231-234, 1981.

MEISTER, A. Glutathione-Ascorbic Acid Antioxidant System in Animals. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, n.13, p. 9397-9400, 1994.

MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. The in vitro stability and in vivo pharmacokinetics of curcumin prepared as an aqueous nanoparticulate formulation. *Biomaterials*, v. 31, p. 6597-6611, 2010.

MORIBE, K.; LIMWIKRANT, W.; HIGASHI, K.; YAMAMOTO, K. Drug Nanoparticle Formulation Using Ascorbic Acid Derivatives. *Journal of Drug Delivery*, ID 138929, 2011.

NIU, Y.; KE, D.; YANG, Q.; WANG, X.; CHEN, Z.; AN, X.; SHEN, W. Temperature-dependent stability and DPPH scavenging activity of liposomal curcumin at pH 7.0. *Food Chemistry*, v. 135, p. 1377-1382, 2012.

OETARI, S.; SUDIBYO, M.; COMMANDEUR, J. N. M.; SAMHOEDI, R.; VERMEUKN, N. P. E. Effects of Curcumin on Cytochrome P450 and Glutathione S-Transferase Activities in Rat Liver. *Biochemical Pharmacology*, v. 51, p. 39-45, 1996.

OMS, Organização Mundial da Saúde. <http://www.who.int/features/qa/15/es/index.html> 2008. Acesso em 19 de maio de 2011.

PIRKEBNER, D.; FUETSCH, M.; WITTMANN, W.; WEISS, H.; HALLER, T.; SCHRAMEK, H.; MARGREITER, R.; AMBERGER, A. Reduction of intracellular pH inhibits constitutive expression of cyclooxygenase-2 in human colon cancer cells. *Journal of Cellular Physiology*, v. 198, p. 295-301, 2004.

PUCCIARELLI, S.; URSO, E.; DESALVO, G. L.; ASCHELE, C.; FRISO, M. L.; RUGGE, M.; TOPPAN, P.; BRUTTOCAO, A.; FABRIS, G.; FERRARO, B.; LONARDI, S.; FREGO, M.; FINCO, C.; LISE, M.; NITTI, D. 5-Fluorouracil and weekly oxaliplatin combined with radiotherapy for locally advanced rectal cancer: Surgical complications and long-term results. *Archives of Medical Research*, v. 37, p. 860-865, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. *Farmacologia*. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

REETA, K. H.; MEHLA, J.; GUPTA, Y. K. Curcumin is protective against phenytoin-induced cognitive impairment and oxidative stress in rats. *Brain Research*, v. 1301, p. 52-60, 2009.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? *Free Radical Biology & Medicine*, v. 49, p. 1603–1616, 2010.

ROSENFELDT, F.; WILSON, M.; LEE, G.; KURE, C.; OU, R.; BRAUN, L.; HAAN, J. Oxidative stress in surgery in an ageing population: Pathophysiology and therapy. *Experimental Gerontology*, v. 48, p. 45-54, 2013.

SA, G; DAS, T. Anti-cancer effects of curcumin: Cycle of life and death. *Cell Division*, v. 3, n. 14, 2008.

SAHU, S. C.; WASHINGTON, M. C. Effect of ascorbic acid and curcumin on quercetin-induced nuclear DNA damage, lipid peroxidation and protein degradation. *Cancer Letters*, v. 63, p. 237 – 241, 1992.

SEMSRI, S.; KRIG, S. R.; KOTELAWALA, L.; SWEENEY, C. A.; ANUCHAPREEDA, S. Inhibitory mechanism of pure curcumin on Wilms' tumor 1 (WT1) gene expression through the PKCa signaling pathway in leukemic K562 cells. *FEBS Letters*, v. 585, p. 2235–2242, 2011.

SHAIKH, J.; ANKOLA, D. D.; BENIWAL, V.; SINGH, D.; KUMAR, M. N. V. R. Nanoparticle encapsulation improves oral bioavailability of curcumin by at least 9-fold when compared to curcumin administered with piperine as absorption enhancer. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 37, p. 223-230, 2009.

SHARMA, R. A.; GESCHER, A. J.; STEWARD, W. P. Curcumin: The story so far. *European Journal of Cancer*, v. 41, p. 1955-1968, 2005.

STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, A. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. *Acta Histochemica*, v. 114, (8), p. 785-796, 2012.

SUN, J.; HAN, J.; ZHAO, Y.; ZHU, Q.; HU, J. Curcumin induces apoptosis in tumor necrosis factor-alpha-treated HaCaT cells. *International Immunopharmacology*, v. 13, p. 170–174, 2012.

VAREED, S. K.; KAKARALA, M.; RUFFIN, M. T.; CROWELL, J. A.; NORMOLLE, D. P.; DJURIC, J.; BRENNER, D. E. Pharmacokinetics of Curcumin Conjugate Metabolites in Healthy Human Subjects. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, v. 17, n.6, p. 1411-1417, 2008.

WANG, Y. J.; PAN, M. H.; CHENG, A. L.; LIN, L. I.; HO, Y. S.; HSIEH, C. Y.; LIN, J. K. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 15, p. 1867-1876, 1997.

WANG, M.; RUAN, Y.; CHEN, Q.; LI, S.; WANG, Q.; CAI, J. Curcumin induced HepG2 cell apoptosis associated mitochondrial membrane potential and intracellular free Ca^{2+} concentration. *European Journal of Pharmacology*, v. 650, p. 41-47, 2011.

WILKEN, R.; VEENA, M. S.; WANG, M. B.; SRIVATSAN, E. S. Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular Cancer*, v. 10:12, p. 2-19, 2011.

XIE, S.; SAO, R.; BRAUN, A.; BOTTONE, E. J. Difference in *Cryptococcus neoformans* cellular and capsule size in sequential pulmonary and meningeal infection: a postmortem study. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, v. 73, p. 49-52, 2012.

YIN, W.; WANG, P.; WANG, X.; SONG, W.; CUI, X.; YU, H.; ZHU, W. Identification of microRNAs and mRNAs associated with multidrug resistance of human laryngeal cancer HEP-2 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 46, p. 546-554, 2013.

10. ANEXO I