

Lualís Edi De David

**Avaliação das atividades citotóxica, antifúngica e do potencial de segurança
in vivo de *ar*-turmerona (*Curcuma longa* L.)**

GUARAPUAVA

2013

LUALÍS EDI DE DAVID

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES CITOTÓXICA, ANTIFÚNGICA E DO POTENCIAL DE
SEGURANÇA *IN VIVO* DE *AR-TURMERONA (Curcuma longa L.)***

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Fármacos, Medicamentos e Biociências Aplicadas à Farmácia, da UNICENTRO em associação ampla com a UEPG.

Orientador: Prof. Dr. Najeh Maissar Khalil

GUARAPUAVA

2013

AGRADECIMENTOS

A Deus, “força maior do universo” pela oportunidade de viver, aprender e contribuir cada vez mais...

A minha querida mãe, Genair, por todo amor, carinho, dedicação e incentivo. A minha irmã, Bianca, que amo muito e ao meu pai, Rudimar, que olha por mim todos os dias.

Ao meu noivo, Vinícius, pelo apoio, compreensão, dedicação e ajuda em todos os momentos, agradeço assim, ao amor incondicional que dedicas à mim. Eu te amo!

A todos os professor do corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UNICENTRO, em especial, pela amizade e paciência de um bom professor: Prof. Dr. Emerson Carraro.

As minhas amigas que tanto me ajudaram Verônica Ambrosini, Gabriela Lindner, Silvana Watanabe e Clescila Altmeyer. Ao apoio sempre incondicional, novamente, obrigada Verônica Ambrosini.

As professoras Profa. Dra. Tania Tominaga e Profa. Dra. Katia Sabrina Paludo por todo auxílio com o cultivo de células. Aos colegas do laboratório de nanotecnologia da UNICENTRO, alunos de iniciação, mestrados e doutorados por toda companhia durante a minha pesquisa.

A contribuição de Fernando Petacci e Silva de Souza Freitas pelo isolamento e caracterização de *ar-turmerona*.

Ao meu orientador por todas as contribuições e dedicação para que meu trabalho fosse o melhor possível.

A CAPES e à Fundação Araucária, pelo apoio financeiro.

RESUMO

O rizoma de *Curcuma longa* L. conhecido popularmente como Açafrão-da-Índia e comercializado como condimento alimentar, possui uma vasta gama de ações biológicas, sendo caracterizado pela presença proeminente de curcumina e compostos do óleo essencial. Os constituintes desses óleos são álcoois sesquiterpênicos e cetonas, dentre eles a *ar-turmerona*. O objetivo do presente trabalho foi investigar a citotoxicidade sobre linhagens de células tumorais, como HEP-2, HRT-18 e HeLa e sua morfologia na presença de *ar-turmerona*, avaliar sua atividade sobre espécies fúngicas, como *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*, além de, verificar a segurança após administração de *ar-turmerona* por 14 dias via gavagem em camundongos Swiss. A atividade citotóxica de *ar-turmerona* apresentou concentração inibitória 50% de 28 e 33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para células HEP-2, 52 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para células HRT-18, 22 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para células HeLa, em 24h e 48h de incubação, respectivamente. Na análise morfológica observou-se arredondamento celular, condensação de cromatina e formação de *blebs*, alterações características da ativação da via apoptótica de morte celular. O ensaio antifúngico demonstrou a atividade de *ar-turmerona* sobre as cepas de *Candida* spp. com concentração inibitória mínima (CIM) entre 62 a 184 (*C. utilis* e *C. krusei*, respectivamente) e 737 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. neoformans*, sendo que, sob a menor concentração de *ar-turmerona* (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) as cepas de *C. tropicalis*, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* ATCC 14053 apresentaram inibição de 30, 34 e 42% das UFC, nesta ordem. As análises bioquímicas e histopatológicas revelaram a segurança do uso de *ar-turmerona* por 14 dias via gavagem devido a não constatação de alterações nos ensaios bioquímicos e histopatológicos. Conclui-se que *ar-turmerona* representa um composto com efetivo potencial citotóxico sobre células tumorais e fúngicas, além de, não apresentar riscos a sua utilização.

Palavras-chave: produtos naturais, *ar-turmerona*, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, citotoxicidade, HEP-2, HRT-18, HeLa e potencial de segurança *in vivo*.

ABSTRACT

The rhizome of *Curcuma longa* L. popularly known as Saffron-of-India and marketed as food condiment has a wide range of biological actions, characterized by the prominent presence of curcumin and compounds of essential oil. The constituents of these oils are sesquiterpene alcohols and ketones, including *ar*-turmerone. The objective of this study was to investigate the cytotoxicity on tumor cell lines, like HEP-2, HRT-18 and HeLa and their morphology in the presence of *ar*-turmerone, to evaluate the activity of *ar*-turmerone on fungal species, such as *Candida* spp. and *Cryptococcus neoformans*, and to investigate the safety after *ar*-turmerone oral administration for 14 days in Swiss mice. The cytotoxic activity of *ar*-turmerone resulted in inhibitory concentration 50% of: 28 and 33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for HEP-2 cells, 52 and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for HRT-18 cells and 22 and 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for HeLa cells at 24h and 48h incubation, respectively. The morphological analysis showed the cell rounding, condensation of chromatin and formation of *blebs* characteristics of activation of apoptotic cell death. The assay demonstrated the antifungal activity of *ar*-turmerone on strains of *Candida* spp. with minimal inhibitory concentration (MIC) from 62 to 184 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (*C. utilis* and *C. krusei*, respectively) and 737 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ for *C. neoformans*. In the lower concentration of *ar*-turmerone (1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) strains of *C. tropicalis*, *C. krusei* ATCC 6258 and *C. albicans* ATCC 14053 were inhibited in 30, 34 and 42% of CFU, in this order. Biochemical and histopathological analysis revealed the safety of using *ar*-turmerone for 14 days by oral gavage due to not finding changes in biochemical tests and histopathological. We conclude that *ar*-turmerone represents a compound with effective potential cytotoxic on tumor and fungal cells, without risk to their use.

Keywords: natural products, *ar*-turmerone, *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, cytotoxicity, HEP-2, HRT-18, HeLa, safety potential *in vivo*.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

- Figura 1** - Foto da planta *Curcuma longa* L. (A) parte aérea da planta e (B) rizoma e pó ... **15**
- Figura 2** - Estrutura química de *ar*-turmerona **17**
- Figura 3** - Desenho esquemático do desenvolvimento de Câncer colorretal. A primeira alteração genômica resulta em mutação no gene *APC* levando a proliferação celular anormal, desenvolvendo os adenomas que após sofrerem nova mutação em *K-ras*, *p53* e perda de 18q originam o carcinoma de cólon. (Adaptado de SANDOUK; JERF; AL-HALABI, 2013) **24**
- Figura 4** - Estrutura química de *ar*-turmerona **34**
- Figura 5** – Avaliação da citotoxicidade de *ar*-turmerona pela redução de MTT sobre linhagem celular HEP-2 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação a 37°C e 5% de CO₂. O controle do solvente foi considerado como 100% de viabilidade celular para cálculos de viabilidade celular. (A) e (B)* difere significativamente do controle de solvente. As concentrações de *ar*-turmerona diferem entre si conforme variação de letras (ANOVA-fator único ($p < 0,05$) pós teste de Tukey) **35**
- Figura 6** - Avaliação da citotoxicidade de *ar*-turmerona pela redução de MTT sobre linhagem celular HRT-18 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação a 37°C e 5% de CO₂. O controle do solvente foi considerado como 100% de viabilidade celular para cálculos de viabilidade celular. (A) e (B)* difere significativamente do controle de solvente. As concentrações de *ar*-turmerona diferem entre si conforme variação de letras (ANOVA-fator único ($p < 0,05$) pós teste de Tukey) **36**
- Figura 7** - Avaliação da citotoxicidade de *ar*-turmerona pela redução de MTT sobre linhagem celular HeLa após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação, a 37°C e 5% de CO₂. O controle do solvente foi considerado como 100% de viabilidade celular para cálculos de viabilidade celular. (A) e (B) * difere significativamente do controle do solvente. As concentrações de *ar*-turmerona diferem entre si conforme variação de letras (ANOVA-fator único ($p < 0,05$) pós teste de Tukey) **37**
- Figura 8** – Diferenciação entre necrose e apoptose celular. Fonte: adaptado de VAN CRUCHTEN, 2002 **41**
- Figura 9** – Alterações morfológicas observadas em células da linhagem HEP-2 após incubação com *ar*-turmerona por 24 h. (A) Células controle, incubadas apenas com RPMI, (B) Células controle de solvente, incubadas com álcool etílico. (C) Células incubadas com 120 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona. (E e F) Células incubadas com 31 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona. Estas pranchas demonstram a condensação e fragmentação de cromatina (▲), formação de

blebs (↑), vacuolização em algumas células (⬆) e arredondamento celular e citoplasma basófilo. Aumento de 1000 X, coloração de May Grunwald-Giensa 43

Figura 10 – Alterações morfológicas observadas em células da linhagem HRT-18 após incubação com *ar*-turmerona por 24 h. (A) Células controle, incubadas apenas com RPMI, (B) Células controle de solvente, incubadas com álcool etílico. (C) Células incubadas com 120 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona. (D e E) Células incubadas com 62 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona. Estas pranchas demonstram a condensação e fragmentação de cromatina (▲), formação de blebs (↑), corpos apoptóticos (⬆) e vacuolização em algumas células (⬆). Aumento de 1000 X, coloração de May Grunwald-Giensa 44

Figura 11 – Alterações morfológicas observadas em células da linhagem HeLa após incubação com *ar*-turmerona por 24 h. (A) Células controle, incubadas apenas com RPMI, (B) Células controle de solvente, incubadas com álcool etílico. (C) Células incubadas com 120 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona. (D e E) Células incubadas com 31 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona. Estas pranchas demonstram o arredondamento celular e perda de adesão (⬆), condensação de cromatina (▲) e citoplasma basófilo. Aumento de 1000 X, coloração de May Grunwald-Giensa 45

Figura 12 - Atividade antifúngica de *ar*-turmerona sobre *C. tropicalis*: UFC.mL⁻¹ (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). * Diferença significativa entre as médias, para porcentagem de inibição de UFC entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único (p < 0,05); pós teste de Tukey) 48

Figura 13 - Atividade antifúngica de *ar*-turmerona sobre *C. krusei* ATCC 6258: UFC.mL⁻¹ (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). * Diferença significativa entre as médias, para porcentagem de inibição de UFC entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único (p < 0,05); pós teste de Tukey) 48

Figura 14 – Atividade antifúngica de *ar*-turmerona sobre *C. albicans* ATCC 14053: UFC.mL⁻¹ (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). A concentração de 92 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona não foi testada por não apresentar UFC. * Diferença significativa entre as médias, para porcentagem de inibição de UFC, entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único (p < 0,05); pós teste de Tukey) 49

Figura 15 - Contagem de UFC de *Cryptococcus neoformans* após ensaio antifúngico com *ar*-turmerona (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). (A) * Diferença significativa entre Controle e concentrações de *ar*-turmerona. (B) * Diferença significativa entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único (p < 0,05); pós teste de Tukey) 50

Figura 16 – Peso dos animais por grupo, avaliados diariamente durante 14 dias de tratamento. Grupo 1: controle administrado Tween 80 a 2%; Grupo 2: administração de *ar*-turmerona 30 mg/Kg; Grupo 3: administração de *ar*-turmerona 60 mg/Kg **51**

Figura 17 - Fotomicrografias de fígados e rins de camundongos Swiss- H&E. A. Rim do Grupo 1; B. Fígado do Grupo 1. C. Rim do Grupo 2; D. Fígado do Grupo 2; E. Rim do Grupo 3. F. Fígado do Grupo 3 **53**

LISTA DE TABELA

Tabela 1 - Efeitos de <i>ar</i> -turmerona em linhagens celulares	18
Tabela 2 - Avaliação morfológica da linhagem celular HEP-2 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação com <i>ar</i> -turmerona a 37°C e 5% de CO ₂ . (A) representa visualização após 24 h e (B) após 48 h de incubação de <i>ar</i> -turmerona. Ausência de símbolos representa morfologia típica das células Hep-2. <i>Ble.</i> – <i>blebs</i> ; <i>deb.</i> – <i>debris</i> ; Des – desadesão; Vac. – vacuolização; Corp. Apop. – corpos apoptóticos. Concentrações de <i>ar</i> -turmerona em µg.mL ⁻¹ . CET - Controle de solvente; CEL – Controle Celular	38
Tabela 3 - Avaliação morfológica da linhagem celular HRT-18 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação com <i>ar</i> -turmerona a 37°C e 5% de CO ₂ . (A) representa visualização após 24 h e (B) após 48 h de incubação de <i>ar</i> -turmerona. Ausência de símbolos representa morfologia típica das células HRT-18. <i>Ble.</i> – <i>blebs</i> ; <i>deb.</i> – <i>debris</i> ; Des – desadesão; Vac. – vacuolização; Corp. Apop. – corpos apoptóticos. Concentrações de <i>ar</i> -turmerona em µg.mL ⁻¹ . CET - Controle de solvente; CEL – Controle Celular	39
Tabela 4 - Avaliação morfológica da linhagem celular HeLa após 24h (A) e 48h (B) de incubação com <i>ar</i> -turmerona a 37°C e 5% de CO ₂ . (A) representa visualização após 24h e (B) após 48h de incubação de <i>ar</i> -turmerona. Ausência de símbolos representa morfologia típica das células HeLa. <i>Ble.</i> – <i>blebs</i> ; <i>deb.</i> – <i>debris</i> ; Des – desadesão; Vac. – vacuolização; Corp. Apop. – corpos apoptóticos. Concentrações de <i>ar</i> -turmerona em µg.mL ⁻¹ . CET - Controle de solvente; CEL – Controle Celular	40
Tabela 5 - CIM de <i>ar</i> -turmerona sobre cepas de <i>Candida</i> spp. pelo ensaio de microdiluição em caldo RPMI, norma M27-A2 modificada (CLSI, 2002). * duas cepas de <i>C. parapsilosis</i> foram testadas nesse experimento; ^c corresponde as cepas clínicas. Demonstração da atividade antifúngica de <i>ar</i> -turmerona após 24 h de incubação a 35 °C	46
Tabela 6 – Níveis plasmáticos dos marcadores bioquímicos após o tratamento com <i>ar</i> -turmerona. Os dados estão expressos como média ± DP (n = 5). * apresentou diferença significativa com controle (Grupo 1)	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP	Difosfato de adenosina
ALT	Alanina aminotransferase
Apaf-1	Fator-1 de ativação de protease apoptótica
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
B16F10	Linhagem celular de melanoma murino
CIM	Concentração Inibitória mínima
CG	Cromatografia Gasosa
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COX-2	Ciclooxigenase - 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EROS	Espécies reativas de oxigênio
EUCAST	European Committee for Antimicrobial Suscetibility Testing
FAL	Fosfatase alcalina
FOLFOX	Fluoruracilo, oxaliplatino, leucovorina
Gene <i>APC</i>	Polipose adenomatosa coli
Hep - 2	Linhagem de carcinoma de laringe
HepG2	Carcinoma hepatocelular
HL-60	Células leucêmicas humanas promielocíticas
HMBC	Correlação heteronuclear de múltiplas ligações
HPV	Papilomavírus humano
HRT-18	Adenocarcinoma colorretal e ileocecal
HSQC	Correlação heteronuclear quântica simples
Huh-7	Carcinoma hepatocelular.
K-562	Linhagem eritroblástica leucêmica
LPS	Lipopolissacarídeos
L1210	Células linfoblásticas leucêmicas
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos humano -1
MMP-9	Metaloproteinase – 9
Molt-4B	Células de leucemia linfocítica humana
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
NADPH oxidase	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase.
NF-κB	Fator de transcrição nuclear Kapa-B
NIST	National Institute of Standards and Technology
NO	Oxido nítrico
NOX	NADPH oxidase presente em fagócitos
PBS	Tampão fosfato salino
PGE-2	Prostaglandina E-2
PTZ	Pentilenotetrazol
RBL-2H3	Linhagem de mastócitos
RMN	Ressonância magnética nuclear
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa
Tween 80	Polissorbato 80
U937	Linfoma histiocítico difuso

SUMÁRIO

RESUMO	4
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
1.1 PRODUTOS NATURAIS	14
1.2 <i>Curcuma longa</i>	14
1.2.1 <i>Ar-turmerona</i>	17
1.3 INFECÇÕES FÚNGICAS	18
1.3.1 <i>Candida spp.</i>	18
1.3.2 <i>Cryptococcus neoformans</i>	21
1.4 TUMORES E TRATAMENTO TERAPÊUTICO	22
1.4.1 Câncer Colorretal	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVOS GERAIS	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 REAGENTES	27
3.1.1 Isolamento e caracterização de <i>ar-turmerona</i>	27
3.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>ex vivo</i> SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS	28
3.2.1 Manutenção das linhagens celulares	28
3.2.2 Preparo da suspensão de células	28
3.2.3 Ensaio citotóxico sobre linhagens de células tumorais	29
3.2.4 Avaliação citotóxica pelo método de redução de MTT	29
3.2.5 Avaliação morfológica das células HEP-2, HRT-18 e HeLa	30
3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA	30
3.3.1 Cepas de <i>Candida spp.</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	30
3.3.2 Preparo do meio de cultivo	31
3.3.3 Ensaio antifúngico	31
3.3.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia	32
3.4 ENSAIO <i>in vivo</i>	32
3.4.1 Ensaios bioquímicos	33
3.4.2 Avaliação histopatológica de camundongos Swiss	33
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	33

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA <i>ex vivo</i> SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS	34
4.1.1 Avaliação da viabilidade celular de células tumorais HEP-2, HRT-18 e HeLa	34
4.1.1.1 Atividade citotóxica de <i>ar</i> -turmerona sobre células HEP-2	34
4.1.1.2 Atividade citotóxica de <i>ar</i> -turmerona sobre células HRT-18	35
4.1.1.3 Atividade citotóxica de <i>ar</i> -turmerona sobre células HeLa	36
4.1.2 Avaliação morfológica das células HEP-2, HRT-18 e HeLa expostas a <i>ar</i> -turmerona .	37
4.2 ENSAIO ANTIFÚNGICO	46
4.2.1 Atividade Antifúngica sobre <i>Candida</i> spp.	46
4.2.1.1 Avaliação da inibição de UFC de <i>Candida</i> spp.	47
4.2.2 Atividade Antifúngica sobre <i>Cryptococcus neoformans</i>	50
4.3 ENSAIO <i>in vivo</i>	50
4.3.1 Avaliação bioquímica	51
4.3.2 Avaliação histopatológica de camundongos Swiss	52
5 CONCLUSÕES	55
6 REFERÊNCIAS	56
ANEXO	71

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 PRODUTOS NATURAIS

As plantas constituem fonte importante de compostos com ampla atividade biológica. Estima-se que 90% da população já tenha usado, pelo menos uma vez, plantas medicinais (SARWAR; ATTITALLA; ABDOLLAHI, 2011). O uso de plantas, para tratamento de enfermidades, remonta aos primórdios da humanidade, sendo que, o registro mais antigo é da Medicina Chinesa realizado pelo imperador Shen Nong (2000 a.C.), descrevendo o potencial medicinal de inúmeras plantas (POSSE, 2007). Segundo dados de Buckingham (1994), a medicina alopática mundial utiliza 119 drogas extraídas de cerca de 90 espécies de plantas.

A utilização dos produtos naturais, principalmente no tratamento de doenças infecciosas, representa uma grande contribuição para a descoberta de novos agentes terapêuticos no combate a micro-organismos multirresistentes (PORFIRIO et al., 2009). Assim, o aperfeiçoamento de moléculas naturais que levem ao aumento de efeitos terapêuticos e a diminuição da toxicidade estão em foco na terapêutica atual (WU; WEN, 2009).

Dados apresentados por Bhavanani e Ballow (1992) apontam que, dentre os óleos essenciais, 60% apresentaram ação antifúngica e 35% atividade antibacteriana. Entre as moléculas liberadas como fármacos, 61% tiveram sua origem em produtos naturais e 74% para compostos com atividade antitumoral (ROUHI; WASHINGTON, 2003). Revisão mais recente aponta que 32% das plantas estudadas apresentavam atividade antioxidante, 13% demonstraram ação antibacteriana e 6% revelaram efeito antifúngico (SARWAR; ATTITALLA; ABDOLLAHI, 2011). Atualmente, mais de 50% das drogas em ensaio clínico com atividade anticâncer são de fonte natural e o tratamento terapêutico de doenças cancerígenas e infecciosas tem como origem os compostos naturais, responsáveis por 60 e 75% das fontes, respectivamente (CRAGG; NEWMAN, 2000; NEWMAN; CRAGG; SNADES, 2003).

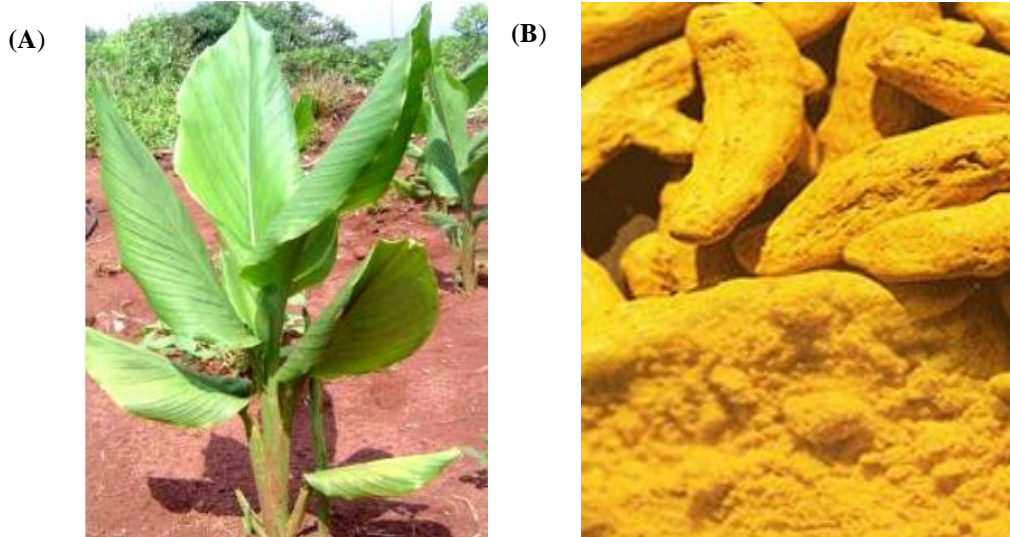
1.2 *Curcuma longa*

A *C. longa* L., de origem no sudeste da Ásia, pertence à família Zingiberaceae e é uma planta do tipo herbácea e perene (Figura 1). Incorporada à agricultura brasileira, a curcuma, também conhecida como Açafrão-da-Índia, tem como seu maior produtor nacional o

norte do estado de Goiás (TAVARES et al., 2010). É no seu rizoma que se encontra o interesse econômico. Seu sabor aromático e picante, levemente amargo caracteriza seu uso como parte do curry, condimento muito utilizado pela cultura indiana. No entanto, não é somente seu caráter nutritivo o alvo de seu emprego, mas também suas propriedades farmacológicas.

A *C. longa* está presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Essa relação é constituída por “plantas medicinais que interessam ao SUS por serem nativas ou exóticas adaptadas, amplamente utilizadas pela população brasileira, e por possuírem algumas evidências para indicação de uso na atenção básica de saúde. No entanto, precisam de estudos para confirmar sua segurança e eficácia, definição da indicação de uso e da forma farmacêutica mais adequada” (PORTAL SAÚDE, 2012). Dados toxicológicos demonstraram que toda substância pode ser um composto com potencial tóxico, dependendo para isso de condições como: exposição, dose administrada, tempo de ação, frequência e via de administração (CASTRO, 1993).

Figura 1 - Foto da planta *Curcuma longa* L. (A) parte aérea da planta e (B) rizoma e pó.



Fontes: (SIGRIST, 2009); <<http://www.agriculturesource.com/b-curcuma+longa+l+p+e/>>

Os “turmeric”, como são conhecidos internacionalmente, possuem diversos compostos químicos. Entre eles zingibereno, curcumenol, eugenol, turmerones, demetoxicurcumina e o mais estudado, a curcumina (CHATTOPADHYAY et al., 2004). A curcumina possui ação inibitória sobre vários micro-organismos (SARWAR; ATTITALLA; ABDOLLAHI, 2011), ação antifúngica (MARTINS et al., 2009; KHALIL et al., 2012), atividade anti-inflamatória e

antioxidante (MENON; SUDHEER, 2007), além de efeito citotóxico (KONG et al., 2009; RAVEENDRAN; BHUVANESHWAR; SHARMA, 2012; PEDROSO et al., 2012). Devido as suas propriedades biológicas, a curcumina é amplamente utilizada na pesquisa sobre doenças crônicas, como na doença de Alzheimer, doença de Parkinson, esclerose múltipla, epilepsia, lesão cerebral, nas doenças cardiovasculares, no câncer, alergias, bronquite, asma, artrite reumatóide, isquemia renal e diabetes (AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009). Conforme o *Food and Drug Administration* (FDA) a curcumina é classificada como "reconhecida geralmente como segura" e diante de vários estudos é considerada segura para uso em humanos (CHAINANI-WU, 2003; AGGARWAL; HARIKUMAR, 2009).

O óleo essencial da *C. longa* é constituído por álcoois sesquiterpênicos e cetonas, produtos secundários do metabolismo vegetal. Sua síntese ocorre nas células glandulares ou epiteliais, ficando o óleo armazenado em vacúolos situados no citoplasma. O óleo extraído do rizoma de *C. longa* tem como componentes predominante os terpenos, correspondendo a maior parte *ar*-turmerona e α -turmerona (NAGHETINI, 2006).

O óleo essencial do rizoma de *C. longa* é eficaz na inibição no desenvolvimento de *Bacillus subtilis*, *Salmonella choleraesuis*, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*, não obtendo efeito sobre *Staphylococcus aureus* (PÉRET-ALMEIDA et al., 2008). A ação antimicrobiana do óleo de *C. longa* também foi demonstrada sobre fitopatógenos como os fungos *Alternaria brassicicola* e *Aspergillus flavipes* (NAGHETINI, 2006) e sobre *Colletotrichum falcatum*, *Fusarium moniliforme*, *Curvularia Pallescens*, *Aspergillus niger* e *Fusarium oxysporium* (SINGH; SINGH; MAURYA, 2002). A associação de curcumina com óleo essencial de *C. longa* (incluindo *ar*-turmerona) apresentaram supressão das células de adenocarcinoma de cólon, configurando conforme o autor um método para a prevenção da inflamação associada à carcinogênese do câncer de cólon (MURAKAMI et al., 2012).

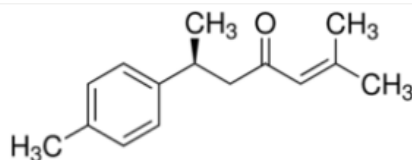
O óleo de *C. longa* possui um potente agente antiplaquetário responsável pela redução na agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno e trombina, sendo que, os constituintes majoritários foram *ar*-turmerona, α e β -turmerona e curlone (PRAKASH et al., 2011). A mesma fração deste óleo, contendo *ar*-turmerona, α -turmerona, β -turmerona, curlone, demonstrou redução dos níveis de cálcio, de espécies reativas de oxigênio (EROS), de NOX e NO, além da redução do potencial da membrana mitocondrial em ensaio com modelo animal de isquemia cerebral (DOHARE; VARMA; RAY, 2008).

1.2.1 *Ar*-turmerona

Ar-turmerona é um composto isolado de *C. longa* L. (Zingiberaceae), com fórmula molecular $C_{15}H_{20}O$, peso molecular de 216.32 e densidade de 0.9634 g/cm^3 (DRUGFUTURE, 2013). É um bisabolano sesquiterpênico que corresponde a 25,3 - 51,7% (NAZ et al., 2010; SINGH; SINGH; MAURYA, 2002) da porção oleosa do rizoma. É encontrado somente em forma S-(+) (ZHANG; RAJANBABU, 2004) identificado como (6 S)-2-metil-6-(4-metilfenil)-2-hepten-4-ona, conforme estrutura química na Figura 2 (DRUGFUTURE, 2013).

A *ar*-turmerona possui inúmeras ações biológicas, entre elas mosquitocida sobre larvas de *Aedes aegyptii* (ROTH; CHANDRA; NAIR, 1998), ação inseticida sobre *Nilaparvata lugens* e *Plutella xyostella* (LEE et al., 2001) e atividade antifúngica sobre patógenos de vegetais (LEE et al., 2003). *Ar*-turmerona possui efeito neutralizante sobre ação hemorrágica, sobre o efeito letal de veneno de *Bothrops jararaca* em camundongos, auxilia na redução do edema após tratamento local com *ar*-turmerona em coelhos envenenados por *Bothrops alternatus* (FERREIRA et al., 1992; MELO et al., 2005).

Figura 2 - Estrutura química de *ar*-turmerona.



Ar-turmerona é capaz de inibir a proliferação de células “Natural Killer” e ativar linfócitos (JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2005), assim como, inibir o aumento do número de glóbulos brancos em células P388D1 (leucemia linfocítica) (KIM et al., 2013). *Ar*-turmerona possui atividade citotóxica sobre células tumorais K562, L1210, U937 e RBL-2H3 (JI et al., 2004), sobre células de linhagens leucêmicas Molt 4B e HL-60 (ARATANECHMUGE et al., 2002), além de, efeito antimelanogênico sobre células B16F10 (PARK et al., 2011).

Tabela 1 - Efeitos de *ar*-turmerona em linhagens celulares.

Células	Ação	Referências
K562, L1210, U937 e RBL-2H3	Citotóxica	JI et al., 2004
U937	Citotóxica e apoptose celular	LEE, 2009
Molt-4B e HL-60	Citotóxica e apoptose celular	ARATANEHEMUGE et al., 2002
P338D1	Antiproliferativa	KIM et al., 2013
“Natural Killers”	Antiproliferativa	JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2005
Câncer de cólon	Prevenção	MURAKAMI et al., 2012
HepG2, Huh-7 e Hep3B	Citotóxica e apoptose celular	CHENG et al., 2012

O efeito apoptótico demonstrado por *ar*-turmerona em células U937, HepG2, Huh-7 e Hep3B foi evidenciado pela indução de Bax, p53 e atuação da caspase-3 (LEE, 2009; CHENG et al., 2012). Avaliação neuroinflamatória de *ar*-turmerona em células microgliais BV-2 resultaram na modificação da expressão de moléculas neuroinflamatórias a partir da inibição da translocação nuclear e ativação de NF- κ B (PARK et al., 2012^a). Em estudo com células tumorais de mama, observou-se que *ar*-turmerona também inibe a ativação de NF- κ B, a atividade enzimática e a expressão de COX-2 e MMP-9, em concentrações não citotóxicas (PARK et al., 2012^b).

1.3 INFECÇÕES FÚNGICAS

1.3.1 *Candida* spp.

Os fungos são micro-organismos eucariontes que possuem íntimo contato com seres humanos, povoando desde a epiderme até mucosas. Espécies de *Candida* spp. existem como microbiota normal em sítios corporais como garganta, área vulvovaginal, pele e intestino ou sendo colonizadores transitórios em outros tecidos (SIDRIM; ROCHA, 2004^a; CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008).

De forma oposta aos vírus e algumas bactérias, os fungos não necessitam causar infecção para sobreviverem, já que constituem a microbiota natural de homens e animais

(CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008; BERTO, 2010). Com isso, os fungos passaram a ser classificados como oportunistas quando deixam de ser inofensivos e passam a desenvolver doenças (GHANNOUM, 2001). Em pacientes imunossuprimidos, as infecções fúngicas ocorrem frequentemente, sendo causadas principalmente por espécies de *Candida* sp., *Aspergillus* sp., *Zygomycetes* sp. e *Cryptococcus* sp. (CARRILLO-MUNOZ et al., 2006; WINN et al., 2008^a).

Com a criação de um desequilíbrio no binômio parasita-hospedeiro os fungos encontram um ambiente favorável para desenvolver seu papel patogênico (SIDRIM; ROCHA, 2004^b). O aumento das infecções fúngicas deve-se ao crescimento da população imunossuprimida, decorrente principalmente da terapêutica antitumoral, da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), dos transplantes de órgãos, pacientes tuberculosos, com lúpus eritematoso e diabetes mellitus (BERTO, 2010).

Em pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) a principal infecção observada é a candidíase oral, sendo também recorrente a candidíase vulvovaginal, o que determina um tratamento oral com fluconazol, de natureza profilática por toda a vida. Em pacientes com imunossupressão, devido a outra origem, observa-se também que a espécie *C. albicans* continua a ser o agente etiológico mais frequente. No entanto, quando trata-se de fungemia, os agentes mais isolados são *C. parapsilosis*, em paciente com cateter vascular e nutrição parenteral e *C. tropicalis* nos pacientes em tratamento de câncer e neutropênicos (COLOMBO et al., 2006).

Entre os anos de 1979 a 2000, houve um aumento de 207% das septicemias causadas por fungos no Estados Unidos (MARTIN et al. 2003), sendo que, 40% das mortes por infecção hospitalar foram de etiologia fúngica (GHANNOUM, 2001). Esta infecção está associada a uma taxa de mortalidade de 10% e 14,5% em pacientes hospitalizados, pediátricos e adultos, respectivamente (ZAOUTIS et al., 2005). Os isolados clínicos de pacientes com candidemia apresentaram taxa de mortalidade maior, quando estes possuíam a capacidade de formar biofilme em relação aos isolados incapazes, sendo 70% versus 45,7%, respectivamente (TUMBARELLO et al., 2007). Comparação entre a mortalidade de *C. não-albicans* (*C. krusei* e *C. glabrata*) e *C. albicans* mostrou que infecções com esta espécie possuem uma taxa de 28% contra 50% das outras (CHESON, 1995).

A alteração na epidemiologia das infecções sanguíneas por *Candida* spp. preocupam quanto ao fato da existência de resistência aos azóis (GHANNOUM, 2001; ALMIRANTE et al., 2005). Apesar de estudos mostrarem mudanças na epidemiologia de infecções causadas por espécies de *Candida* spp. (GHANNOUM, 2001), ainda encontram-se dados onde a

espécie majoritária é *C. albicans* (43,7% dos casos de candidemia), seguida de *C. tropicalis* (18,3%), *C. parapsilosis* (15,6%), *C. glabrata* (10,7%) e *C. krusei* (2%) (ANDES et al., 2012). Na América Latina e no Brasil ocorreram mudanças no perfil de isolamento de *Candida* spp., chegando a prevalecer as espécies não-*albicans* como *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (MIMÍCA et al., 2009).

Com o uso generalizado de antifúngicos, como tratamento preventivo ou curativo, promove-se a seleção de espécies resistentes aos fármacos usuais (MOTTA, 2010), demonstrada pelo fato de infecções decorrentes de *C. glabrata* e *C. krusei* se manifestarem em pacientes que utilizaram antifúngicos azólicos (COLOMBO et al., 2006). Espécies de *C. não-albicans* já apresentam resistência ao fluconazol, assim como, em isolados clínicos de candidíase de orofaringe essa resistência ao fluconazol foi observada juntamente com a resistência cruzada ao itraconazol e ao cetoconazol (CHESON, 1995; LAGUNA et al., 1997; TUMBARELLO et al., 2007). *C. krusei* com sensibilidade diminuída a anfotericina B, CIM de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e *C. tropicalis* resistente à 5-fluocitosina em 8,6% dos isolados testados (ALMIRANTE et al., 2005; MIMÍCA et al., 2009). Pacientes HIV positivo apresentaram 9,5% dos isolados clínicos de *Candida* spp. com CIM acima de $64 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de fluconazol, entre os isolados estão: *C. albicans*, *C. krusei* e *C. tropicalis* (ENWURU, 2008).

Entre as classes antifúngicas de maior aplicação no tratamento de infecções sistêmicas estão as classes de polienos, azóis e equinocandinas (CHAPMAN; SULLIVAN; CLEARY, 2008). A anfotericina B é um antimicrobiano poliênico, produzido por bactérias que habitam o solo, *Streptomyces nodosus*. Esse fármaco é administrado em infecções fúngicas sistêmicas com amplo espectro de ação, que inclui *C. albicans*, *C. neoformans*, *Aspergillus* spp., *Histoplasma capsulatum* entre outros fungos de micoses sistêmicas invasivas. No entanto, essa terapêutica possui como um dos seus efeitos adversos a toxicidade do fármaco que manifesta-se através de anemia, leucopenia, trombocitopenia e nefrotoxicidade (PATEL, 1998). Devido ao dano renal apresentado pela anfotericina B surge um impasse entre o tratamento da infecção e o desenvolvimento de nova patologia.

Os azóis são fármacos antifúngicos sintéticos, amplamente utilizados, representados por fluconazol, voriconazol, cetoconazol, etc. Todos os fármacos desta classe estão associados ao aumento de transaminases, e ao itraconazol, frequentemente, insuficiência hepática (TAN et al., 2006). A utilização de fluconazol na profilaxia a longo prazo e no tratamento de candidíase oral recorrente ocorre entre a prática médica, o que leva ao surgimento de infecções por *C. albicans* resistentes a terapêutica em doses convencionais (MARTIN, 1999). A utilização profilática prolongada com itraconazol em pacientes com AIDS resulta em

suscetibilidade reduzida ao fármaco e resistência cruzada ao fluconazol (GOLDMAN et al., 2000). O resultado dessa seleção é a modificação das espécies de *Candida* spp. responsáveis pelas infecções, abrindo lugar para as espécies de *C. não-albicans* (GHANNOUM, 2001).

1.3.2 *Cryptococcus neoformans*

Entre as espécies de criptococos, o responsável por grande parte das infecções nos seres humanos é o *Cryptococcus neoformans*. Trata-se de uma levedura com capacidade de se encapsular, cujo habitat natural é o solo. É um patógeno intracelular que pode sobreviver e replicar dentro de macrófagos. A formação da cápsula polissacarídica, constituída principalmente de glucuronoxilomanana, proporciona um mecanismo para aderência nos revestimentos da mucosa e proteção contra fagocitose (ZARAGOZA et al., 2007; WINN et al., 2008^b). Este processo facilita o trânsito através da corrente sanguínea, sendo um mecanismo de disseminação até seu principal sítio de infecção pelo qual tem tropismo, o sistema nervoso central (ZARAGOZA et al., 2007). Além deste mecanismo de virulência também é capaz de produzir células titan, melanina, proteinases, manoproteínas e liberar metabólitos polióis úteis à invasão e destruição celular (WINN et al., 2008^b). A formação de células titan - células diferenciadas e alargadas podendo ter entre 50 e 100 µm de diâmetro - estão associadas a promoção da infecção pulmonar inicial (CRABTREE et al., 2012).

A meningite e a pneumonia são as manifestações clínicas primárias de infecção por *C. neoformans* (PIROFSKI; CASADEVALL, 1996). A infecção inicial é geralmente controlada em hospedeiros imunocompetentes, levando a um estado latente assintomático (ZARAGOZA et al., 2007). Apesar de se tratar de um micro-organismo avirulento, pelas características apresentadas e pelo potencial em causar risco de vida em meningoencefalite, não é contagioso. A modificação de seu estado de avirulento para espécie virulenta qualifica-se quanto ao hospedeiro em que haverá interação (PIROFSKI; CASADEVALL, 1996; CASADEVALL; PIROFSKI, 2001).

A incidência de infecções por *C. neoformans* teve acréscimo importante nos últimos 20 anos em consequência da epidemia do vírus HIV e uso de terapias imunossupressoras (CASADEVALL; PERFECT, 1988). Essa incidência crescente se apresenta proporcional a disseminação do HIV (HEITMAN et al., 2011). Dados representativos do ano de 1998, apontam que 10% das infecções sistêmicas fúngicas nos EUA foram diagnosticadas como criptococose, sendo que 79% das hospitalizações por criptococose ocorreram em pacientes

HIV positivo (WILSON et al., 2002). Estimativas globais, apontam que, anualmente, aproximadamente 1 milhão de pessoas desenvolvam meningite criptocócica, e que mais de 600 mil venham a óbito após os três primeiros meses da infecção por *C. neoformans* (PARK et al., 2009). Em estudo realizado nas fezes de aves, outro habitat natural do fungo, observou-se que das 17 cepas de *Cryptococcus* spp. isoladas 11,7% apresentavam resistência ao fluconazol (GONZÁLEZ-HEIN; GONZÁLEZ-HEIN; JARABRÁN, 2010).

Diante do aumento constante das infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. e *C. neoformans*, associado ao cenário de pacientes imunossuprimidos e ao desenvolvimento de resistência aos poucos fármacos existentes surge a necessidade de novas estratégias terapêuticas, principalmente, a partir de metabólitos secundários de plantas medicinais.

1.4 TUMORES E TRATAMENTO TERAPÊUTICO

Os órgãos e tecidos de um animal adulto são mantidos por um balanço entre a renovação e a morte celular. O câncer é uma doença caracterizada por alterações no genoma celular, tendo como alicerces a ativação de oncogenes dominantes e/ou a perda da função de genes supressores de tumores (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O desenvolvimento tumoral parte de uma célula normal onde ocorrerá uma hiperplasia, com aumento da proliferação celular, displasia e indução de angiogênese, chegando a formação de um tumor sólido e em alguns casos propagação de algumas células pelo organismo, desencadeando a metástase (BERGERS; HANAHAN; COUSSENS, 1998).

Os genes supressores de tumores agem no controle do ciclo celular, regulando a divisão e diferenciação celular (CURTO et al., 2007). É a partir da transformação maligna da célula, que ela passa a se proliferar independentemente de estímulos de fatores de crescimento. Este processo de transformação pode ser gerado por agentes químicos (reagentes alquilantes do DNA) ou agentes físicos (luz ultravioleta e radiação ionizante) que promovem mutação celular (GOLDSBY; KINDT; OSBORNE, 2002).

Após quase quatro décadas de rápidos avanços em pesquisas sobre o câncer, mais de 100 tipos distintos da doença e subtipos de tumores em órgãos específicos foram classificados. A quimioterapia continua a ser um desafio ao tentar destruir as células neoplásicas e preservar as células normais. Até certo ponto, dispomos de terapias alvo específico que atuam bloqueando os sinais de crescimento das células tumorais, reduzindo o fornecimento de nutrientes para estas células e/ou ainda, estimulando o sistema imunológico a

reconhecer e destruir as células tumorais. Entre os fármacos utilizados para o tratamento antitumoral estão duas categorias, que dividem-se nos fármacos de ciclo-específicos e ciclo-não-específicos. São classificados como de ciclo-específicos os alcalóides da vinca (vincristina e vimblastina) que atuam como antimitóticos, antimetabólitos (5-fluorouracila e metotrexato) e taxanos isolados de espécies do gênero *Taxus* (Taxaceae). Entre os medicamentos de ciclo-não-específicos estão os antibióticos antitumorais (doxorubicina), análogos da platina (cisplatina e oxaliplatina), antraciclina e campotecinas (BOGO, 2009; SILVA, 1994). Apesar das inúmeras possibilidades de tratamento, já foram registrados casos de resistência a vincristina e paclitaxel em glioblastomas e astrocitomas resistentes a carboplatina, cisplatina e paclitaxel (SCHOR, 2009). Assim como, a resistência à cisplatina observada no tratamento de câncer de pulmão de células não-pequenas (YANG et al., 2013).

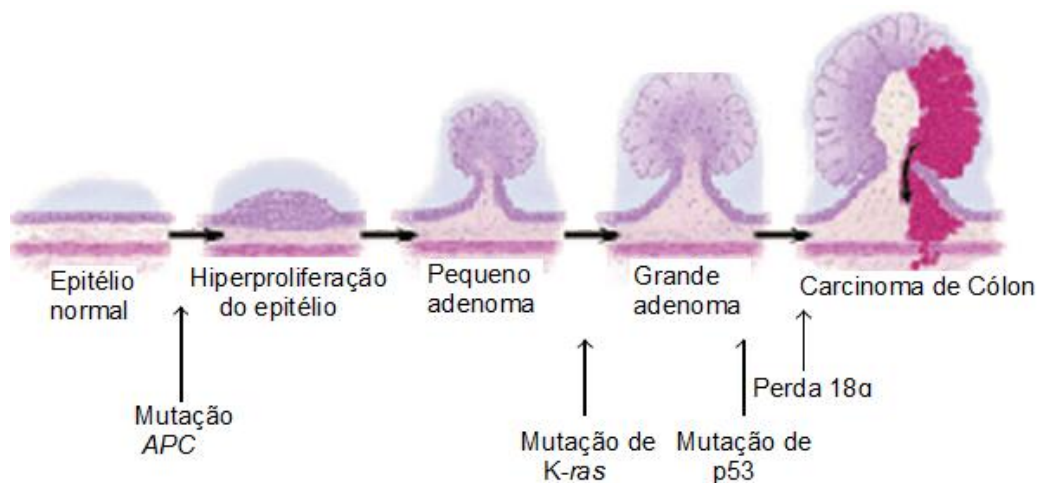
1.4.1 Câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) abrange tumores que acometem um segmento do intestino grosso (o cólon) e o reto. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), apontam que cerca de 95% dos cânceres de cólon são do tipo adenocarcinoma, que acomete as células produtoras de muco e fluido intestinal. O CCR apresenta uma alta incidência e taxa de mortalidade de 33% em países desenvolvidos (CUNNINGHAM et al., 2010). Segundo dados do INCA, estima-se, no Brasil, mais de 30 mil novos casos de câncer de cólon e reto em 2012, sendo que no ano de 2010 mais de 13 mil pacientes foram a óbito. A incidência de câncer colorretal se aproxima de 100% na polipose adenomatosa familiar (PAF) (WARRIER; KALADY, 2012).

A doença, geralmente, inicia-se a partir de pólipos que caracterizam-se por projeções benignas na parede interna do intestino grosso. A progressão para o câncer colorretal resulta da transformação do epitélio colônico normal, denominados pólipos adenomatosos, em lesões malignas, os adenocarcinomas (BODGER, 2000). De maneira lenta, geralmente envolvendo vários anos e com um número considerável de alterações genéticas os adenomas colorretais podem sofrer malignização, evoluindo para adenocarcinomas (VIJAN et al., 2004). Através da hiperproliferação do epitélio - mutação no gene *APC* - formam-se os pequenos adenomas que após mutação de *K-ras* aumentam seu tamanho, somados a isso, a combinação da mutação *p53* e a perda de 18q (gene *DCC*), levam a modifica em células malignas (SANDOUK; JERF; AL-HALABI, 2013) (Figura 3). Estima-se que 60% dos casos de câncer

colorretal por adenomas progredirá por via supressora, geralmente iniciado por uma mutação do gene *APC* (JASS, 2007).

Figura 3 - Desenho esquemático do desenvolvimento de Câncer colorretal. A primeira alteração genômica resulta em mutação no gene *APC* levando a proliferação celular anormal, desenvolvendo os adenomas que após sofrerem nova mutação em *K-ras*, *p53* e perda de 18q originam o carcinoma de cólon. (Adaptado de SANDOUK; JERF; AL-HALABI, 2013).



A absorção de nutrientes do intestino é realizada, em grande parte, pelas veias mesentéricas. Este aparato circulatório proporciona uma vasta área para invasão e disseminação de células tumorais. Assim, um dos implicadores no tratamento do câncer colorretal é também o tratamento de pacientes com metástase hepática (INNOCENTI et al., 2010). Estima-se que 10 a 20% dos pacientes com câncer colorretal sejam diagnosticados já em estágio IV, ou seja, apresentam metástase em locais como fígado, pulmões, rins, estômago, duodeno, pâncreas e pélvis (NATIONAL FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH, 2013). O tratamento quimioterápico é atualmente a única estratégia terapêutica disponível em casos de câncer colorretal com metástase hepática "não-operável", tornando assim a doença ressecável e disponibilizando a melhor forma para cura deste paciente (ADAM et al., 2011). A adição de fármaco antiangiogênico, bevacizumabe, na terapêutica com oxaliplatina, 5-fluorouracila e leucovorina aumenta a duração da sobrevida para pacientes com CCR metastático (GIANTONIO et al., 2007).

No entanto, a utilização de oxaliplatina provoca a síndrome de obstrução sinusoidal causada por sua hepatotoxicidade, o que representa um evento adverso deste fármaco (RUBBIA-BRANDT et al., 2004) e risco de esplenomegalia em pacientes tratados com

FOLFOX (5-fluorouracila, oxaliplatina, leucovorina) (MIURA et al., 2011). Devido a dificuldades no tratamento do câncer, pelo acréscimo da incidência de tumores malignos resistentes e toxicidade dos fármacos administrados, há a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antineoplásicos.

O desenvolvimento de novos fármacos para doenças em expansão é o alvo para uma melhor qualidade de vida aos pacientes. A resistência fúngica e a ineficácia e toxicidade dos tratamentos antitumorais incentivam a busca por novos compostos. Deste modo, propõem-se o estudo com *ar*-turmerona objetivando sua ação antifúngica e seu potencial citotóxico sobre células tumorais.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi avaliar a citotoxicidade de *ar*-turmerona sobre linhagens de células tumorais e sobre espécies fúngicas patogênicas e o potencial de segurança após 14 dias de administração via gavagem em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a atividade citotóxica *ex vivo* de *ar*-turmerona frente a células tumorais HEp-2, HRT-18 e HeLa.
2. Avaliar ação antifúngica de *ar*-turmerona sobre:
 - a) cepas de *Candida* spp. clínicas e *C. albicans* ATCC[®] 14053, *C. albicans* ATCC[®] 64546 e *C. krusei* ATCC[®] 6258 e
 - b) *C. neoformans* ATCC[®] 90112.
3. Determinar o potencial de segurança da administração oral de *ar*-turmerona a partir de marcadores bioquímicos e análise histológica em fígados e rins de camundongos machos Swiss.

3 METODOLOGIA

3.1 REAGENTES

Os reagentes utilizados foram: meio de cultivo RPMI-1640 (HIMEDIA®), tampão MOPS (SIGMA®), ágar Sabouraud dextrose (HIMEDIA®) e cloreto de sódio (NaCl) 0,85% (BIOTEC®) e anfotericina B (Iffect Chemphar Co., Ltd, China). Para ensaio de citotoxicidade em células tumorais utilizou-se meio de cultivo Iscove's (Modified Dulbecco's Médium – SIGMA®), solução tampão fosfato sem cálcio e sem magnésio (PBS) para lavagens, soro fetal bovino a 10% (GIBCO®), penicilina (10000 U.I./ml) e estreptomicina a 1% (SIGMA-ALDRICH®), tripsina (SIGMA-ALDRICH®) e o MTT (3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromida) (SIGMA-ALDRICH®), polisorbato 80 (Tween 80 - SIGMA-ALDRICH®).

3.1.1 Isolamento e caracterização de *ar-turmerona*

A extração do composto *ar-turmerona* foi realizado de acordo com os procedimentos adotados nos laboratórios de fitoquímica (OLIVEIRA et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2010) na UFG pelos professores Dr. Fernando Petacci e Dra. Silvia Souza Freitas. Procedeu-se a adição do rizoma de *C. longa* seco e triturado (500 g) a 1000 mL de hexano, esta mistura foi mantida à temperatura ambiente sob agitação por 4 h. Após, foi filtrada em funil de Büchner utilizando papel filtro e o solvente eliminado em evaporador rotativo a baixa pressão. A fração oleosa resultante da extração foi separada por cromatografia em coluna (CC) [Si(OH)₂] (Vetec, 60-270 mesh) e eluída com a mistura hexano:acetato de etila (9:1). As frações isoladas foram coletadas e analisadas por cromatografia em camada delgada (0,20mm Sílica gel 60 Macherey-Nagel) por comparação com padrão previamente isolado e identificado de *ar-turmerona*, a fim de se obter maior rendimento possível com alto grau de pureza. A fração isolada com CC que continha a maior quantidade do óleo extraído dos rizomas foi caracterizada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN ¹H, ¹³C, HSQC e HMBC - BRÜCKER 500 MHz (¹H), AVANCE) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-17 A Shimadzu, GCMS-QP 5000 Shimadzu, Coluna DB-5 30 m x 0,32 mm) pela ionização de impacto de elétrons à 60°C (3 min); 5 °C/min até 240°C (8 min); temperatura do injetor: 180°C; temperatura do detector: 260°C; volume de injeção: 1

μL . Os espectros de massas obtidos foram comparados com banco de dados NIST-62 (TAVARES et al., 2013).

3.2 ATIVIDADE CITOTÓXICA *ex vivo* SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

3.2.1 Manutenção das linhagens celulares

As células utilizadas são células humanas HEP-2 (ATCC CCL-23), adenocarcinoma colorretal e ileocecal - HRT-18 (ATCC CCL-244) e adenocarcinoma cervical - HeLa (ATCC CCL-2), adquirida do Instituto Adolf Lutz e doadas pela professora Dra. Katia Sabrina Paludo, respectivamente. As células foram cultivadas aderidas em garrafa de polipropileno em meio de cultura RPMI 1640, suplementado com soro fetal bovino a 10%, solução de penicilina (10.000 U.I./ml) e estreptomicina (10mg/ml) a 1% (FRESHNEY, 1994; HARRISON; RAE, 1997). Após, manipulou-se em ambiente e com materiais estéreis, sendo as garrafas incubadas em estufa (QUIMIS[®]) a 37 °C e 5% de CO₂ gasoso. As subculturas foram realizadas a cada três dias, quando se obteve viabilidade celular suficientemente alta (mínimo de 95%) para realização dos ensaios.

3.2.2 Preparo da suspensão de células

As subculturas mantidas em garrafas foram visualizadas em microscópio de luz invertida (BEL Photonics[®]), observando o crescimento das células no fundo da garrafa. Removeu-se o meio de cultura e foi realizada a limpeza com 5 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) pH= 7,4, a fim de remover o meio de cultura restante. Posteriormente, adicionou-se 3 mL de tripsina (0,03% de EDTA). A função da tripsina como enzima proteolítica é digerir as proteínas da matriz extracelular e as proteínas transmembrana e a do EDTA é quelar o Ca²⁺ do qual depende a adesão entre as células e entre as células e a matriz extracelular. Em seguida, inativou-se a tripsina com adição de meio de cultivo contendo soro fetal bovino a 10%. Este volume foi centrifugado (Centribio[®]) em tubo falcon a 1000 rpm durante 1 minuto. Ao final, descartou-se o sobrenadante sem perder o pellet de células (FRESHNEY, 1994).

A ressuspensão das células foi realizada em 1 mL de meio de cultivo, homogeneizando-se as células cuidadosamente. Após, realizou-se a determinação da

viabilidade celular por contagem em câmara de Neubauer pelo método de exclusão de corante “azul de tripan”, para obtenção da taxa de viabilidade celular em porcentagem (FRESHNEY, 1994).

3.2.3 Ensaio citotóxico sobre linhagens de células tumorais

Os testes foram realizados em placa estéril de 96 poços, com contagem final de 1×10^4 células.mL⁻¹ em cada poço em meio RPMI e incubadas por 24 h a 37 °C e 5 % de CO₂ gasoso. Após, retirou-se o meio de cultivo com cautela para não danificar as células aderidas a placa e adicionou-se as drogas em diferentes concentrações completando o volume para 200 µL de meio de cultivo. O controle negativo (ausência de drogas) e controle celular (contendo álcool etílico) fizeram parte do experimento, sendo que todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram incubadas por 24 h e 48 h. Ao final de cada período o meio de cultivo foi retirado cuidadosamente e adicionou-se o MTT.

3.2.4 Avaliação citotóxica pelo método de redução de MTT

O MTT é um composto amarelo que sofre redução por desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente ativas, formando um produto chamado de formazana (MOSMANN, 1983). Este se acumula dentro das células em forma de cristais azuis, que são solubilizados pela adição de álcoois. Assim, quanto maior a viabilidade celular, maior será a redução do MTT e desta forma, maior a absorvância espectrofotométrica em 570 nm (DENIZOT; LANG, 1986; CARMICHAEL et al., 1987).

As células foram incubadas com 70 µL de MTT 0,5 mg.mL⁻¹. Ao final de 2 horas, retirou-se o MTT e solubilizou-se os cristais azuis formados pela adição de 100 µL de eluente, álcool isopropílico ácido (0,1 M de HCl). Após completa solubilização analisou-se o produto formado, formazana, por espectrofotometria (Spectra MAX 190®) em 570 e 630 nm.

Com a leitura dos poços em 570 e 630 nm foi realizada uma subtração para obtenção do valor real de absorvância, sendo que, a formazana possui absorção em 570 nm e as células viáveis presentes nos poços causam uma turvação observada em 630 nm. O controle celular de solvente é o resultado do crescimento das células em presença de álcool etílico. A viabilidade celular foi calculada usando a seguinte equação:

Viabilidade (%): \bar{X} ABS dos poços com drogas/ \bar{X} ABS do controle celular X 100, onde:

ABS: absorvância e \bar{X} : Média

Como parâmetro para determinação da citotoxicidade, foi utilizado o valor de CI_{50} (concentração capaz de induzir a morte de 50% das células), a partir das diferenças de viabilidade dos poços contendo *ar*-turmerona e controle celular.

3.2.5 Avaliação morfológica através de microscopia de luz das células HEp-2, HRT-18 e HeLa.

A análise morfológica observou a ação citotóxica induzida pelo tratamento com *ar*-turmerona nas células das linhagens tumorais HEp-2, HRT-18 e HeLa através da fixação e visualização microscópica. $2,5 \times 10^4$ células foram incubadas por 24 horas sobre lamínulas de vidro redondas em placas de 24 poços. Após, foram submetidas ao tratamento com diferentes concentrações de *ar*-turmerona e incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram fixadas com formol 2% e coradas com o corante hematológico May-Grunwald-Giemsa, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro e as células foram avaliadas em microscópio Olympus e fotografadas com câmera Olympus Digital DP-25.

3.3 TESTE DE SENSIBILIDADE ANTIFÚNGICA.

3.3.1 Cepas de *Candida* spp. e *Cryptococcus neoformans*

As leveduras usadas para o ensaio antifúngico foram as cepas *American Type Culture Collection* (ATCC) de *C. albicans* ATCC 14053, *C. albicans* ATCC 64546, *C. krusei* 6258 e 4 isolados clínicos de *Candida* spp. do Laboratório Central do Estado do Paraná – LACEN, além da cepa de *Cryptococcus neoformans* ATCC 90112. Entre as quatro espécies de *Candida* spp. isoladas e doadas pelo LACEN estão *C. tropicalis*, *C. utilis* e duas cepas *C. parapsilosis*.

3.3.2 Preparo do meio de cultivo

O meio de cultivo foi preparado a partir da pesagem 10,4 g de RPMI-1640 em pó (com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato) e 34,53 g de tampão de MOPS (ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico). Dissolveu-se o meio em 900 mL de água destilada. Acrescentou-se o tampão (concentração final de 0,165 mol.L⁻¹), agitando até dissolver. Ajustou-se o pH para 7,0 a 25 °C utilizando hidróxido de sódio 1 mol.L⁻¹. Ao final, acrescentou-se água adicional para levar o meio ao volume final de 1 litro. A esterilização foi realizada por filtração em filtro de poro 22 µm e armazenou-se a 4 °C.

3.3.3 Ensaio Antifúngico

O teste de sensibilidade para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) de *ar-turmerona* e a contagem de unidades formadoras de colônias (UFC), foi desenvolvido baseando-se na Normativa M27-A2 do CLSI através da técnica de microdiluição. O meio de cultivo usado foi RPMI 1640 e RPMI suplementado com glicose 20 g.L⁻¹ (2%) para *Candida* spp. e *C. neoformans*, respectivamente (CLSI, 2002; EUCAST). Os repiques foram realizados em ágar Sabouraud com 24 h e 48 h de antecedência para *Candida* spp. e *C. neoformans*, respectivamente. O inóculo foi ajustado em espectrofotômetro a 0,08 a 0,1 de absorvância (JASCO®) ao qual foi adicionado meio de cultivo para obter a concentração final de 0,5 a 2,5 x 10³ UFC.mL⁻¹ para espécies de *Candida* spp. (CLSI, 2002) e 0,5 a 5 x 10⁵ UFC.mL⁻¹ para *C. neoformans* (EUCAST).

O experimento foi realizado em placas de microdiluição estéreis com distribuição das drogas no volume de 5 µL, o inóculo correspondendo a 100 µL e o meio de cultivo completando o volume para 200 µL. Os controles empregados são controles de crescimento (controle positivo), controle de esterilidade (controle negativo), controle do solvente (controle positivo contendo 5 µL etanol), controle com anfotericina B e controle negativo das drogas, garantindo que não exista contaminação de *ar-turmerona* por micro-organismos.

Após a distribuição de todas as drogas as placas de microdiluição foram incubadas em estufa bacteriológica (QUIMIS®) a 35 °C por 24 h. Ao final de 24 h de incubação realizou-se a leitura visual da turvação para *Candida* spp. e *C. neoformans*. A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a “menor concentração que apresenta proeminente redução do crescimento comparando-se ao crescimento no controle positivo” (CLSI, 2002), cerca de

90% de inibição. Cada concentração foi avaliada em triplicata e cada cepa foi testada em quatro ensaios independentes.

3.3.4 Contagem de Unidades Formadoras de Colônia (UFC)

O plaqueamento foi realizado nas concentrações de *ar-turmerona* que apresentaram menor turvação que o controle positivo, a partir do teste antifúngico de microdiluição. Foi realizada a diluição 1:100 em microtubos de centrifugação para minimizar a contagem na placa. Esta solução foi plaqueada em ágar sabouraud dextrose no volume de 20 μL e incubada por 24 h a 35 °C. Após este período cada placa teve suas UFC contadas e calculou-se a concentração em UFC.mL^{-1} com base na diluição e volume plaqueado.

3.4 ENSAIO *in vivo*

Quinze camundongos Swiss machos, com peso médio de 29 g, foram mantidos em gaiolas comunitárias, aclimatizados com ração e água *ad libitum*, temperatura ambiente controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa do ar (60-80%) e ciclo claro-escuro de 12 horas por 5 dias. Todos os procedimentos utilizados seguiram os “*Principles of Laboratory Animal Care*” do *National Institutes of Health* (NIH) além de serem encaminhados ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual do Centro-Oeste com parecer favorável, ofício nº 122/2013 parecer 073/2013.

Após o período de ambientação, iniciou-se o experimento onde os animais permaneceram em ambiente controlado, e em jejum alimentar por 1 hora antes da administração de *ar-turmerona*, recebendo alimentação 30 minutos após a gavagem. Os grupos foram divididos em: controle (administrado Tween 80 a 2%; grupo 1), *ar-turmerona* (30 mg/Kg; grupo 2), *ar-turmerona* (60 mg/Kg; grupo 3). A *ar-turmerona* foi administrada por via oral, na forma de gavagem gástrica, dissolvida em Tween 80 a 2% por 14 dias. Os animais foram avaliados diariamente quanto ao peso corporal para controle do mesmo e cálculo para administração de *ar-turmerona*. Ao final do experimento os animais foram anestesiados com xilazina e cetamina, via intramuscular, na dose de 20 mg/kg e 50 mg/kg respectivamente, cada uma delas em seringa separada, para realização da coleta de amostras sanguínea por punção cardíaca seguida da eutanásia por deslocamento cervical. Após a

eutanásia o fígado e os rins foram rapidamente retirados e armazenados em solução de formol 10% para avaliação histopatológica. O sangue foi coletado em tubos heparinizados e centrifugados em 3000 rpm por 10 minutos para obtenção do plasma. Este foi utilizado para a análise bioquímica de enzimas indicativas de hepatotoxicidade e produtos de degradação para análise de nefrotoxicidade: alanina aminotransferase (AST), aspartato aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (FAL), creatinina e uréia.

3.4.1 Ensaios bioquímicos

A avaliação das enzimas hepáticas, da uréia e creatinina foram realizadas logo após a coleta e centrifugação do sangue heparinizado para obtenção do plasma. As metodologias foram seguidas conforme definição dos kit de cada ensaio (Creatinina, FAL, AST e ALT - BIOCLIN[®]; Uréia - LABTEST[®]).

3.4.2 Avaliação histopatológica de camundongos Swiss

Os órgãos foram removidos e então depositados em frasco contendo formol a 10%. Os frascos foram encaminhados ao HISTOCENTER – Anatomia Patológica e Citopatologia (Guarapuava, Paraná) para confecção das lâminas e elaboração de laudo pela Dra. Michelle Gusmão de Assis. Os cortes histológicos foram corados com hematoxilina/eosina (H&E), analisados e fotografados em um microscópio.

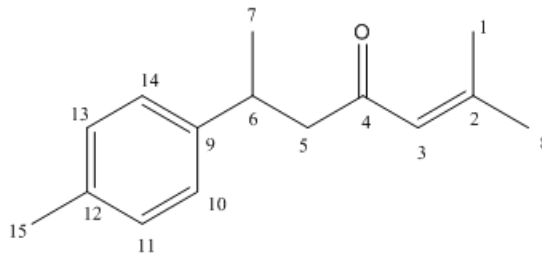
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados estão apresentados como média \pm desvio padrão (DP). Comparações estatísticas foram feitas pela ANOVA (Excel, 2010; Prism 5). Diferenças foram consideradas estatisticamente significantes com $p < 0,05$ pela comparação entre as médias pelo pós teste Tukey, onde os resultados expressos significam que letras diferentes correspondem a valores que diferem entre si significativamente e letras iguais valores que não diferem entre si significativamente nas colunas.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A caracterização realizada por RMN e CG - espectrômetro de massas permitiu a identificação do composto como sendo *ar*-turmerona segundo Tavares et al., 2013 (Figura 4).

Figura 4 – Estrutura química de *ar*-turmerona



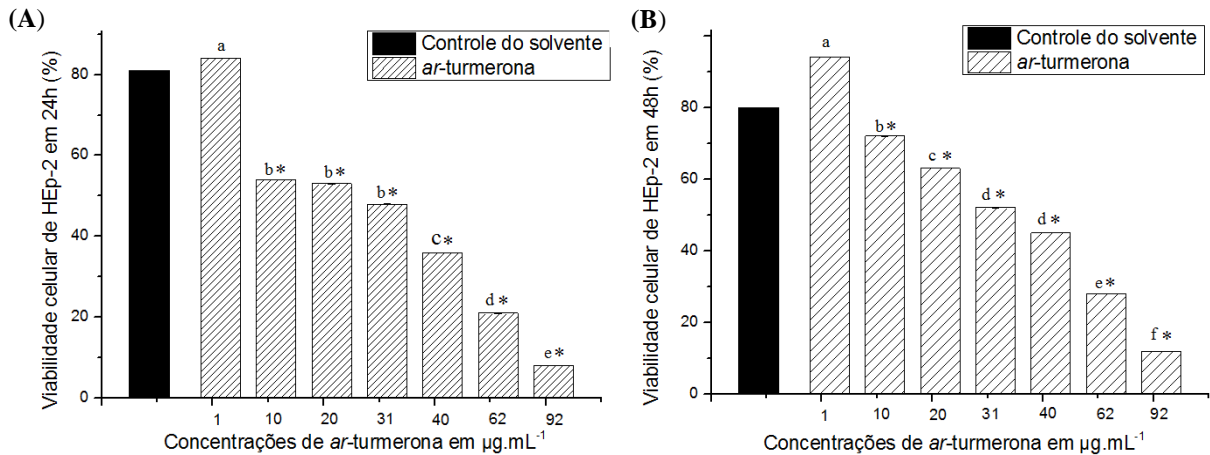
4.1 ATIVIDADE CITOTÓXICA *ex vivo* SOBRE LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

4.1.1 Avaliação da viabilidade celular de células tumorais HEP-2, HRT-18 e HeLa

4.1.1.1 Atividade citotóxica de *ar*-turmerona sobre células HEP-2

A ação citotóxica de *ar*-turmerona sobre a linhagem celular HEP-2 foi avaliada utilizando diferentes concentrações do composto após 24 h e 48 h de incubação (Figura 5). O ensaio com 24h de incubação, revelado com MTT, demonstrou como viabilidade celular os valores de: 85%, 54%, 53%, 48%, 36%, 21% e 8% para 1, 10, 20, 31, 40, 62 e 92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona, respectivamente. Após 48 h de incubação a viabilidade celular observada foi de 94%, 74%, 63%, 52%, 45%, 28% e 12%, para as mesmas concentrações de *ar*-turmerona do ensaio com 24 h de incubação. Como pode ser observado, a ação de *ar*-turmerona sobre a linhagem celular HEP-2 mostrou-se concentração-dependente. A concentração capaz de induzir a morte de aproximadamente 50% (CI_{50}) das células foi determinada a partir da aproximação àquela concentração que permitiu a viabilidade mais próxima de 50% das células, levando a um CI_{50} de 28 e 33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona em 24 h e 48 h de incubação do ensaio, respectivamente.

Figura 5 - Avaliação da citotoxicidade de *ar*-turmerona pela redução de MTT sobre linhagem celular HEP-2 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação a 37°C e 5% de CO₂. O controle do solvente foi considerado como 100% de viabilidade celular para cálculos de viabilidade celular. (A) e (B)* difere significativamente do controle de solvente. As concentrações de *ar*-turmerona diferem entre si conforme variação de letras (ANOVA-fator único ($p < 0.05$) pós teste de Tukey).

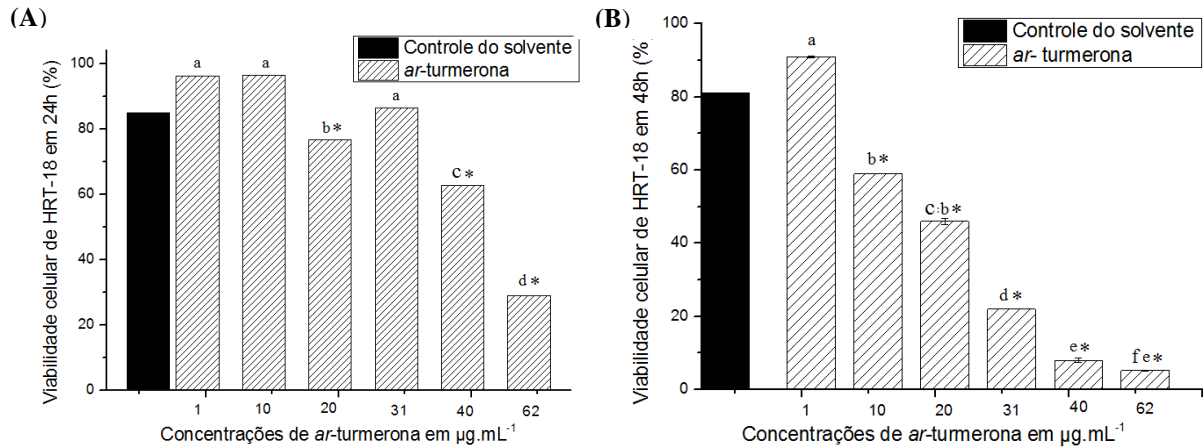


4.1.1.2 Atividade citotóxica de *ar*-turmerona sobre células HRT-18

O ensaio citotóxico *ex vivo* de células HRT-18 com 24 h de incubação demonstrou que as menores concentrações (1, 10, 20 e 31 µg.mL⁻¹) de *ar*-turmerona apresentaram baixa atividade citotóxica (96%, 96,5%, 77% e 87%, respectivamente), por outro lado, a ação de 40 e 62 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona resultou na viabilidade 62% e 29% das células, respectivamente. Após 48 h de incubação de *ar*-turmerona, as células HRT-18 demonstraram uma viabilidade celular de 91%, 59%, 46%, 22%, 8% e 5% com 1, 10, 20, 31, 40 e 62 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona (Figura 6).

A atividade citotóxica das células HRT-18 mostrou-se concentração-dependente para o ensaio de 24 h a 48 h de incubação. Sendo que a principal concentração a demonstrar esse perfil foi através da utilização de 40 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona, onde em 24 h de incubação a viabilidade obtida foi de 62% e em 48h de 8% das células viáveis (Figura 6). Este efeito também foi observado por Lee (2009) onde as células U937 apresentaram-se menos viáveis após 48 h de incubação com *ar*-turmerona. A CI₅₀ para as células HRT-18 foi de 52 e 20 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona para 24 h e 48 h de incubação, respectivamente.

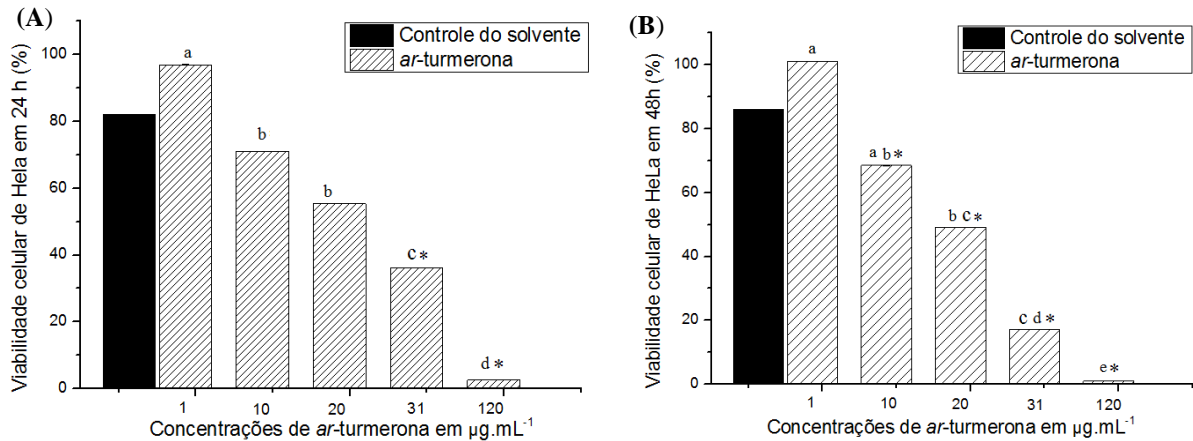
Figura 6 - Avaliação da citotoxicidade de *ar*-turmerona pela redução de MTT sobre linhagem celular HRT-18 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação a 37°C e 5% de CO₂. O controle do solvente foi considerado como 100% de viabilidade celular para cálculos de viabilidade celular. (A) e (B)* difere significativamente do controle de solvente. As concentrações de *ar*-turmerona diferem entre si conforme variação de letras (ANOVA-fator único ($p < 0,05$) pós teste de Tukey).



4.1.1.3 Atividade citotóxica de *ar*-turmerona sobre células HeLa

Após 24 h de incubação do ensaio *ex vivo* com células HeLa observou-se uma viabilidade celular de 97%, 71%, 55%, 36% e 2,5% para 1, 10, 20, 31 e 120 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona. A incubação das células HeLa por 48 h revelou ação de *ar*-turmerona na ordem de 100%, 68%, 49%, 17% e 1% de células viáveis, com as mesmas concentrações de *ar*-turmerona (Figura 7). A atividade citotóxica de *ar*-turmerona sobre células HeLa resultou em CI₅₀ muito próximas para as incubações de 24 h e 48 horas, representada por 22 e 20 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona, respectivamente.

Figura 7 - Avaliação da citotoxicidade de *ar*-turmerona pela redução de MTT sobre linhagem celular HeLa após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação, a 37°C e 5% de CO₂. O controle do solvente foi considerado como 100% de viabilidade celular para cálculos de viabilidade celular. (A) e (B) * difere significativamente do controle do solvente. As concentrações de *ar*-turmerona diferem entre si conforme variação de letras (ANOVA-fator único ($p < 0,05$) pós teste de Tukey).



O desvio padrão obtido nos ensaios acima foi adicionado aos gráficos, porém, não resultaram em barra de erro para visualização pelo pequeno valor que representavam.

4.1.2 Avaliação morfológica de células HEp-2, HRT-18 e HeLa expostas a *ar*-turmerona

Foi realizado, primeiramente, um screening das alterações morfológicas após 24h e 48h de incubação das células em placas de 96 poços com concentração de 1×10^4 células, demonstrado nas Tabela 3, 4 e 5. Para obtenção de pranchas foi realizada a análise morfológica com as concentrações intermediárias de *ar*-turmerona, visto que, as concentrações de 369 e 184 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona induzem efeitos citotóxicos muito intensos, resultando em desadesão e morte de praticamente todas as células em cultura, dificultando a análise. De outra forma, as concentrações de 20, 10 e 1 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona não induzem ou induzem alterações morfológicas muito discretas. Assim, as concentrações utilizadas foram 120, 62 e 31 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona (Figuras 9, 10 e 11).

Após 24 h de incubação de *ar*-turmerona a avaliação visual da morfologia das células HEp-2 demonstrou alteração em todas as concentrações testadas, incluindo o controle de etanol com aproximadamente 15% das células arredondadas. As concentrações de 369 a 184 µg.mL⁻¹ de *ar*-turmerona resultaram em arredondamento de 100% da cultura de células, formação de *blebs* e desadesão celular, já as concentrações de 120 a 62 µg.mL⁻¹ apresentaram

80% de arredondamento celular, formação de *blebs* e corpos apoptóticos e desadesão celular. Utilizando-se 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona também ocorreu 80% de arredondamento celular, formação de *blebs* e corpos apoptóticos. Incubando as células com 31 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona observou-se 50% de arredondamento celular e formação de *blebs* e utilizando 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ observou-se apenas o arredondamento de aproximadamente 15% das células (Tabela 2).

Tabela 2 - Avaliação morfológica da linhagem celular HEp-2 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação com *ar*-turmerona a 37°C e 5% de CO₂. (A) representa visualização após 24 h e (B) após 48 h de incubação de *ar*-turmerona. Ausência de símbolos representa morfologia típica das células Hep-2. *Ble.* – *blebs*; *deb.* – *debris*; Des – desadesão; Vac. – vacuolização; Corp. Apop. – corpos apoptóticos. Concentrações de *ar*-turmerona em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. CET - Controle de solvente; CEL – Controle Celular.

Teste	Arredondamento celular				<i>Ble.</i>	<i>Deb.</i>	Des.	Vac.	Corp. Apop
	100%	80%	50%	15%					
CEL									
CET				A;B					
369	A;B				A;B		A;B		
184	A;B				A;B		A;B		
120	A;B				A;B		A;B		
92		A;B			A;B		A;B		A;B
62		A;B			A;B		A;B		A;B
40		A;B			A;B		A;B		A;B
31			A;B		A;B				
20			A;B		A;B				
10			A;B		A;B				
1				A;B					

Transcorridas 24 h e 48 h de incubação de *ar*-turmerona sobre as células HRT-18 o que se observou com 369 a 184 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona foi o arredondamento celular de 100% da cultura, desadesão total das células, formação de *blebs*, além da formação de fragmentos celulares – *debris*. Porém, utilizando 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona visualizou-se o arredondamento de 60% da cultura, formação de *blebs*, corpos apoptóticos, desadesão celular e vacuolização. A incubação com 62 e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona promoveu o

arredondamento de 30% da cultura celular, desadesão celular e formação de *blebs*. Sendo que, as demais concentrações (10 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *ar-turmerona* permaneceram iguais aos controles empregados (Tabela 3).

Tabela 3 - Avaliação morfológica da linhagem celular HRT-18 após 24 h (A) e 48 h (B) de incubação com *ar-turmerona* a 37°C e 5% de CO₂. (A) representa visualização após 24 h e (B) após 48 h de incubação de *ar-turmerona*. Ausência de símbolos representa morfologia típica das células HRT-18. *Ble.* – *blebs*; *deb.* – *debris*; *Des* – desadesão; *Vac.* – vacuolização; *Corp. Apop.* – corpos apoptóticos. Concentrações de *ar-turmerona* em $\mu\text{g.mL}^{-1}$. CET - Controle de solvente; CEL – Controle Celular.

Teste	Arredondamento celular						<i>Ble.</i>	<i>Deb.</i>	<i>Des.</i>	<i>Vac.</i>	<i>Corp. Apop.</i>
	100%	90%	60%	50%	30%	10%					
CEL											
CET											
369	A; B						A	A; B	A; B		
184	A; B						A	A; B	A; B		
120	A; B						A	A; B	A; B		
92	A; B						A	A; B	A; B		
62	A; B						A	A; B	A; B		
40	B		A					A; B	A; B	A	
31		B				A	B	B	B		B
20				B		A	B	B	B		B
10					B		B	B	B		
1										B	

A avaliação visual, após 24 h e 48 h de incubação de *ar-turmerona*, revelou nas células da linhagem HeLa o arredondamento de 100% da cultura celular, a formação de *blebs*, *debris* e perda de adesão das células (369 a 184 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar-turmerona*). Com a incubação de 120 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar-turmerona* visualizou-se o arredondamento das células em 70% da cultura, a desadesão, formação de *blebs* e corpos apoptóticos. Por fim, a utilização de 62 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar-turmerona* provocaram o arredondamento das células em 20% e 10% da cultura celular, respectivamente (Tabela 4).

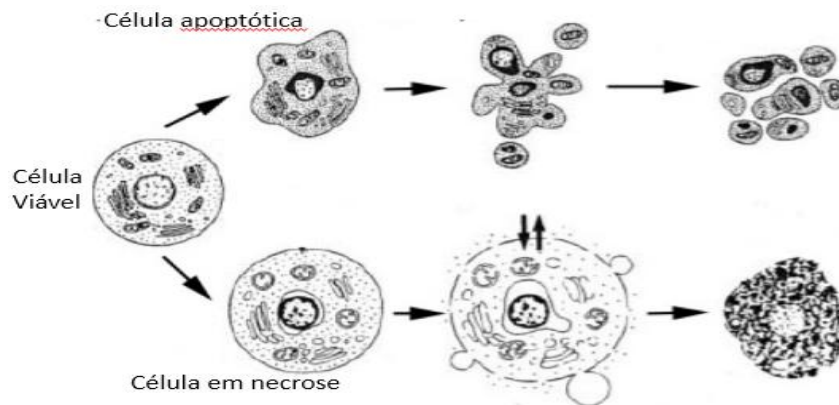
Tabela 4 - Avaliação morfológica da linhagem celular HeLa após 24h (A) e 48h (B) de incubação com *ar*-turmerona a 37°C e 5% de CO₂. (A) representa visualização após 24h e (B) após 48h de incubação de *ar*-turmerona. Ausência de símbolos representa morfologia típica das células HeLa. *Ble.* – blebs; *deb.* – debris; Des – desadesão; Vac. – vacuolização; Corp. Apop. – corpos apoptóticos. Concentrações de *ar*-turmerona em µg.mL⁻¹. CET - Controle de solvente; CEL – Controle Celular.

Teste	Arredondamento celular						<i>Ble.</i>	<i>Deb.</i>	Des.	Vac.	Corp. Apop.
	100%	90%	80%	40%	20%	10%					
CEL											
CET											
369	A; B						A; B	A; B	A; B		
184	A; B						A; B	A; B	A; B		
120	A; B						A; B	A; B	A; B		
92	A; B						A; B	A; B	A; B		
62	A; B						A; B	A; B	A; B		
40			B	A			A; B	B	A; B		B
31					A	B	B	B	B		B
20						A					
10											
1											

A morte celular é responsável pelo equilíbrio celular do organismo contrabalanceando a proliferação celular, entre os mecanismos estão a necrose e a apoptose (Figura 8). A necrose, processo patológico – “acidental”, é iniciada por perturbações externas, traumas físicos, estresse químico ou hipóxia tecidual. Desenvolvendo suas características morfológicas que são: inchaço celular inicial, seguido por lise celular e resposta inflamatória (VAN DER MEER et al., 2010).

Porém, a morte celular programada – apoptose – é necessária para o desenvolvimento de órgãos e manutenção da homeostase, tendo como características o encolhimento celular, a condensação da cromatina, desintegração nuclear, externalização de fosfatidilserina, formação de *blebbing* e corpos apoptóticos que são fagocitados impedindo a reação inflamatória (WYLLIE; KERR; CURRIE, 1980; VAN DER MEER et al., 2010).

Figura 8 – Diferenciação entre necrose e apoptose celular. Fonte: adaptado de VAN CRUCHTEN, 2002.



Pertencente ao grupo de produtos naturais com atividade antineoplásica, os terpenos possuem ação antimetabólica de importante valor médico (BELANGER, 1998; FERNANDES et al., 2005). A *ar*-turmerona apresentou ação citotóxica sobre HEP-2, HRT-18 e HeLa, assim como, sobre outras linhagens de células tumorais, conforme Tabela 1 (ARATANECHMUGE et al., 2002; JI et al., 2004; JAYAPRAKASHA; RAO; SAKARIAH, 2005; LEE, 2009; MURAKAMI et al., 2012; KIM et al., 2013). As alterações morfológicas visualizadas nas células são consequências de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos geneticamente regulados.

As alterações morfológicas observadas, com a coloração May-Grunwald-Giemsa, demonstram que os efeitos citotóxicos são induzidos no início da incubação com a *ar*-turmerona. As concentrações utilizadas para análise morfológica na linhagem celular HEP-2 demonstraram a indução de alterações morfológicas compatíveis com a morte celular por apoptose (Figura 9). Observando-se um grande número de células com condensação e fragmentação de cromatina e formação de *blebs*.

A linhagem de células de carcinoma humano de cólon, HRT-18, também apresentou tais alterações morfológicas (Figura 10), mas apenas na concentração de $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$, demonstrando ser mais resistente que a HEP-2 ao efeito citotóxico induzido pela *ar*-turmerona, visto que, na concentração de $62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona observou-se alterações discretas, como vacúolos em algumas células e citoplasma basófilo. A linhagem de adenocarcinoma humano de cérvix, HeLa, assim como a HEP-2, também se apresentou bastante sensível aos efeitos citotóxicos de *ar*-turmerona. O que se observou foi o arredondamento e perda de adesão celular, além de condensação de cromatina e citoplasma basófilo (Figura 11).

A observação das alterações morfológicas em células HEp-2, HRT-18 e HeLa revelaram, principalmente, a presença de *blebs*, arredondamento celular, desadesão e formação de corpos apoptóticos, característicos de células em processo apoptótico. Esta via de morte celular é preferencial ao observarmos a ausência de processo inflamatório local, o que causaria danos as células vizinhas considerando que estas poderiam ser células sadias do organismo. Porém uma característica de células em processo de necrose, foi observada em algumas concentrações, onde visualizou-se a formação de *debris*, que são fragmentos celular decorrentes da lise celular, fato que desencadeia o processo inflamatório. Assim, outros ensaios são necessários para esclarecer a via de morte celular em que *ar-turmerona* atua sobre as células estudadas.

Alguns estudos já elucidaram a via de atuação de *ar-turmerona*, sendo que, segundo Aratanechemuge et al. (2002) as alterações morfológicas em células Molt 4B e HL-60 (presença de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA) decorrentes da ação de *ar-turmerona* devem-se a indução da apoptose. A apoptose induzida por *ar-turmerona* em HepG2 foi confirmada pela anexina V, fragmentação do DNA, produção de EROS, dissipação do potencial de membrana mitocondrial, aumento de Bax e p53, translocação mitocondrial de Bax e ativação de caspase-3, 8, 9, além de ser mediada pela ativação de ERK e JNK quinase (CHENG et al., 2012). Lee (2009) associou a ação anti-tumorogênica de *ar-turmerona* em células U937 à indução de Bax e p53, ao em vez de Bcl-2 e p21, resultando na ativação de caspase-3, fato que desencadeia o início do processo de apoptose intrínseca e extrínseca das caspases.

Figura 9 – Alterações morfológicas observadas em células da linhagem HEP-2 após incubação com *ar*-turmerona por 24 h. (A) Células controle, incubadas apenas com RPMI, (B) Células controle de solvente, incubadas com álcool etílico. (C) Células incubadas com $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona. (D e E) Células incubadas com $31 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona. Estas pranchas demonstram a condensação e fragmentação de cromatina (\blacktriangle), formação de blebs (\uparrow), vacuolização em algumas células (\uparrow) e arredondamento celular e citoplasma basófilo. Aumento de 1000 X, coloração de May Grunwald-Giensa.

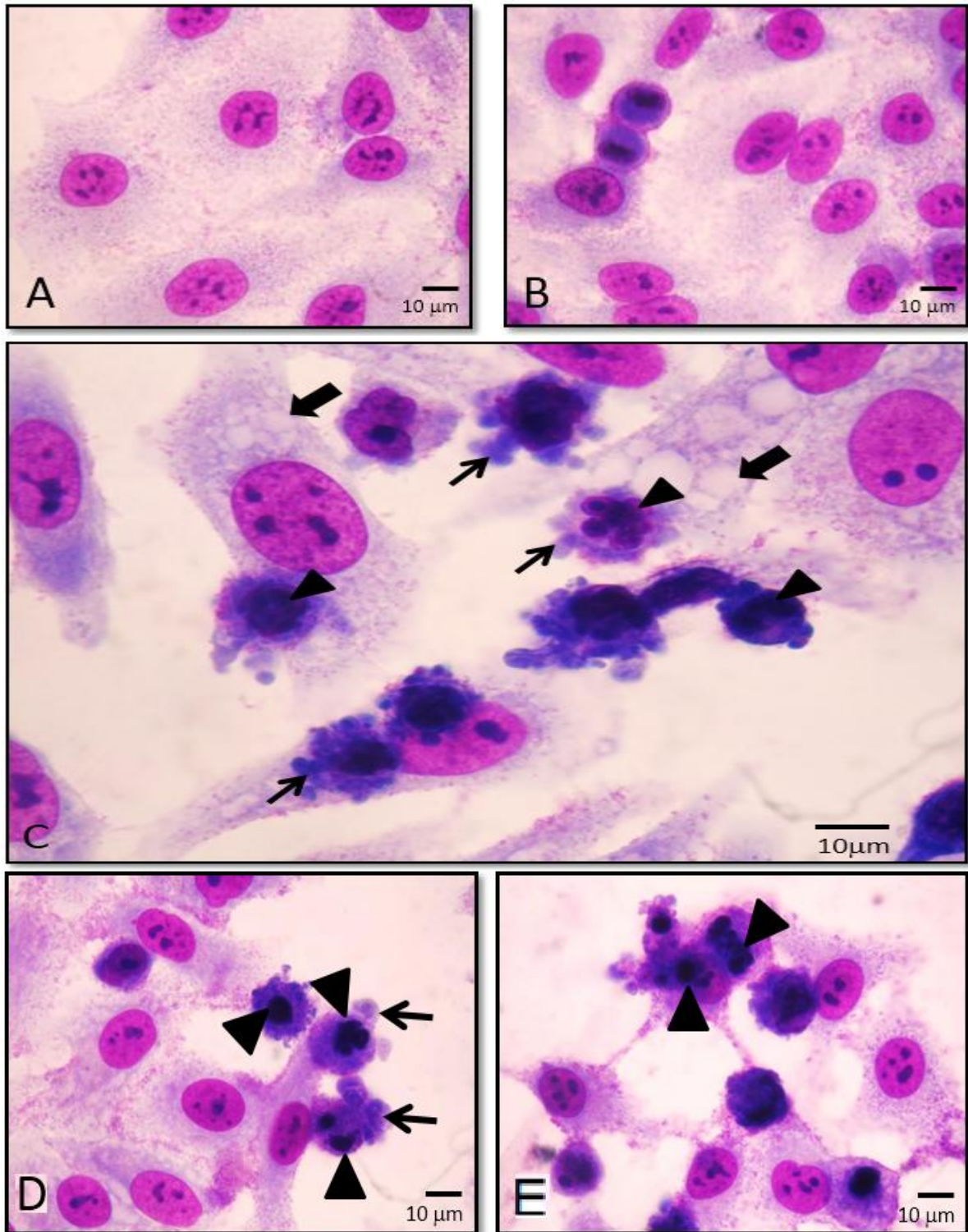


Figura 10 – Alterações morfológicas observadas em células da linhagem HRT-18 após incubação com *ar*-turmerona por 24 h. (A) Células controle, incubadas apenas com RPMI, (B) Células controle de solvente, incubadas com álcool etílico. (C) Células incubadas com $120 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona. (D e E) Células incubadas com $62 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona. Estas pranchas demonstram a condensação e fragmentação de cromatina (\blacktriangle), formação de blebs (\uparrow), corpos apoptóticos ($\hat{\uparrow}$) e vacuolização em algumas células (\blackuparrow). Aumento de 1000 X, coloração de May Grunwald-Giensa.

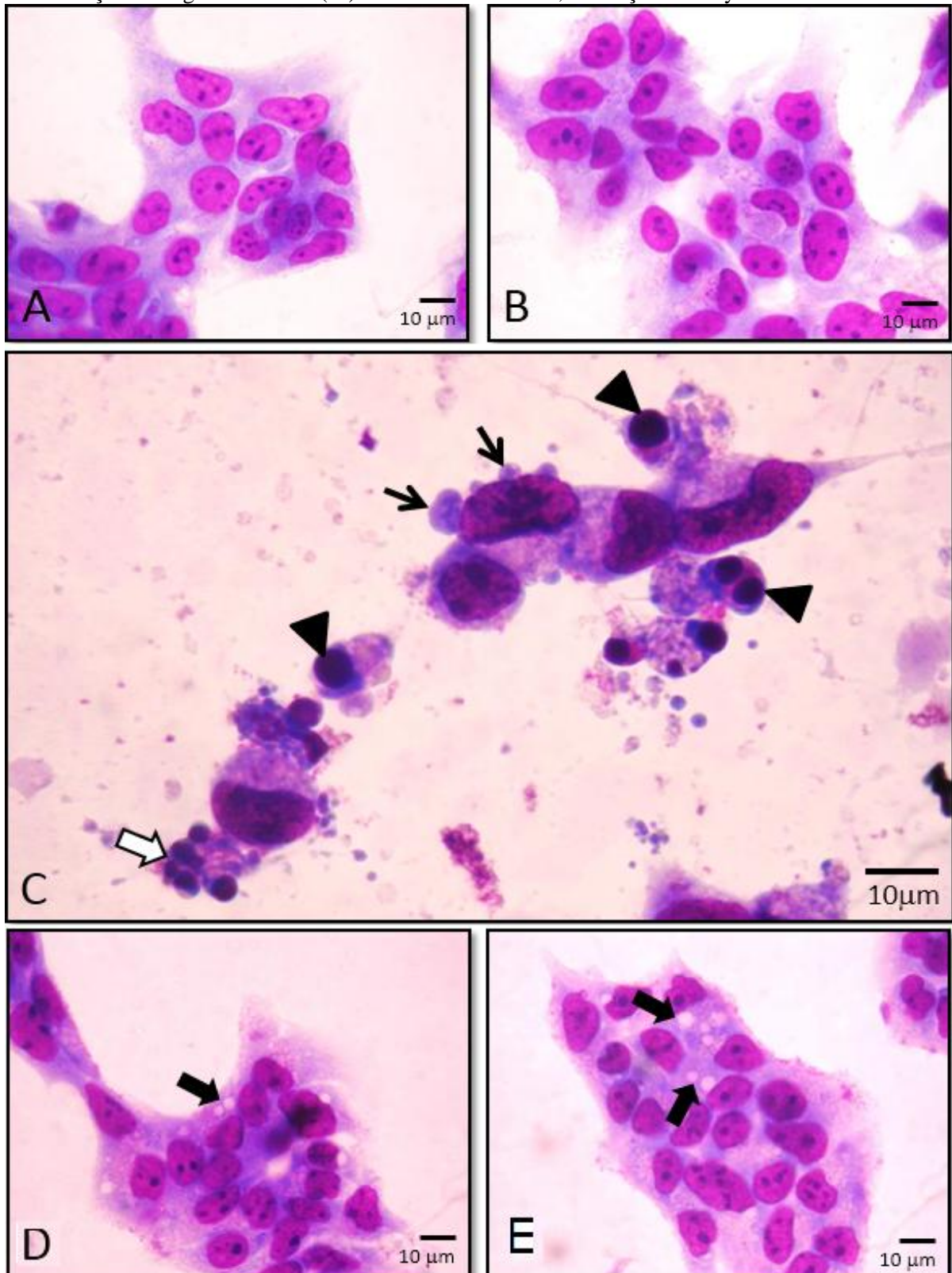
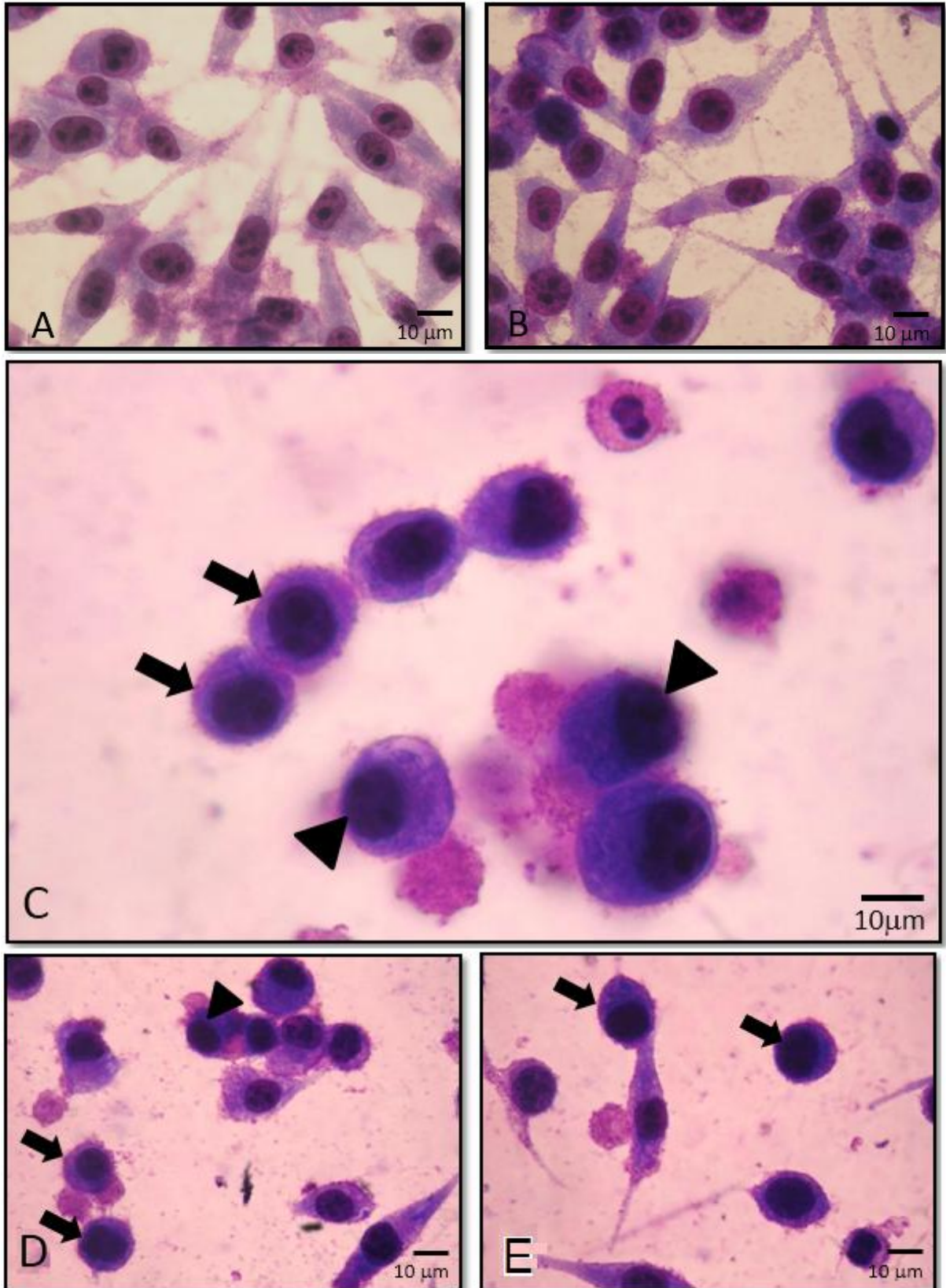


Figura 11 – Alterações morfológicas observadas em células da linhagem HeLa após incubação com *ar*-turmerona por 24 h. (A) Células controle, incubadas apenas com RPMI, (B) Células controle de solvente, incubadas com álcool etílico. (C) Células incubadas com $120 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona. (D e E) Células incubadas com $31 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona. Estas pranchas demonstram o arredondamento celular e perda de adesão (▲), condensação de cromatina (▲) e citoplasma basófilo. Aumento de 1000 X, coloração de May Grunwald-Giensa.



4.2 ENSAIO ANTIFÚNGICO

4.2.1 Atividade Antifúngica sobre *Candida* spp.

Foram avaliadas 7 cepas *Candida* spp., sendo 4 obtidas de amostras clínicas de pacientes do LACEN – PR: *C. utilis*, *C. tropicalis* e duas *C. parapsilosis*. Cepas ATCC de *C. albicans* ATCC 14053, ATCC 64546 e *C. krusei* ATCC 6258.

A suscetibilidade dos fungos testados com *ar*-turmerona resultou em uma ampla faixa de variação de CIM, estando entre 62 a 184 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Candida* spp. O perfil de suscetibilidade à anfotericina B, antifúngico de uso padrão, após 24h de incubação esteve entre 0,125 e 0,25 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 5).

O CIM de *ar*-turmerona após 24 h de incubação demonstrou um menor valor para *C. utilis* (62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), sendo que as cepas de *C. albicans* ATCC 14053 e *C. tropicalis* apresentaram CIM de *ar*-turmerona variando de 62 a 92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Enquanto que, *C. albicans* ATCC 64546 e duas cepas de *C. parapsilosis* resultaram em 92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ como CIM para *ar*-turmerona. A CIM de *ar*-turmerona para espécies de *Candida* spp. foi mais elevada para a espécie de *C. krusei* ATCC 6258 com variação entre 92 a 184 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Tabela 5).

Tabela 5 - CIM de *ar*-turmerona sobre cepas de *Candida* spp. pelo ensaio de microdiluição em caldo RPMI, norma M27-A2 modificada (CLSI, 2002). * duas cepas de *C. parapsilosis* foram testadas nesse experimento; ^c corresponde as cepas clínicas. Demonstração da atividade antifúngica de *ar*-turmerona após 24 h de incubação a 35 °C.

	<i>Ar</i> -turmerona ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Anfotericina B ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	62 – 92	0,125
<i>C. albicans</i> ATCC 64546	92	0,125 – 0,25
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	92 – 184	0,5
<i>C. utilis</i> ^c	62	0,125
<i>C. tropicalis</i> ^c	62 - 92	0,125 – 0,25
<i>C. parapsilosis</i> ^c *	92	0,125

A *C. albicans* é o principal patógeno fúngico em humanos e animais (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010). Contudo, destaca-se a proeminente identificação de infecções sanguíneas causadas por espécies de *Candida* não-*albicans*. Sendo a *C. tropicalis* e a *C. parapsilosis* as mais prevalentes, apresentando perfil de sensibilidade variável (MÍMICA et al., 2009). Tratando-se de um baixo número de agente antifúngicos disponíveis, abre-se mão

da ação fúngica dos óleos essenciais (AGARWAL; LAL; PRUTHI, 2010). A atividade antimicrobiana de *ar-turmerona*, sesquiterpeno presente no óleo essencial de *C. longa*, foi demonstrada contra inúmeros micro-organismos (NEGI et al., 1999; SINGH; SINGH; MAURYA, 2002; LEE et al., 2003; NAGHETINI, 2006; PÉRET-ALMEIDA et al., 2008). Ação do óleo de *C. longa* sobre dermatófitos (*Trichophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum*) e sobre o fungo *Sporothrix schenckii* resultou em inibição destes com as diluições de 1:40 a 1:320 preparado em etilenoglicol (APISARIYAKUL; VANITTANAKOM; BUDDHASUKH, 1995) e CIM sobre os mesmos dermatófitos foi de 3,9 a 7,8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar-turmerona*, sendo que a ação do miconazol foi obtida com CIM de 54,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (JANKASEM; WUTHI-UDOMLERT; GRITSANAPAN, 2013). A utilização de 500 ppm de *ar-turmerona* foi capaz de suprimir *Phytophthora infestans* e *Erysiphe graminis*, fungos fitopatogênicos (LEE et al., 2003).

A atividade antifúngica de *ar-turmerona* sobre *Candida* spp. resultou em valores de CIM que estão de acordo com o declarado na literatura, comparando-se com o óleo essencial de *C. longa*, que tendo como componente majoritário *ar-turmerona* (70%), apresentou ação antimicrobiana sobre *S. aureus* (CIM de 5,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *Lactobacillus plantarum* (CIM de 2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), *Fusarium senectum* (CIM de 52,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *Aspergillus niger* (CIM de 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) (TAKEUCHI, 2012).

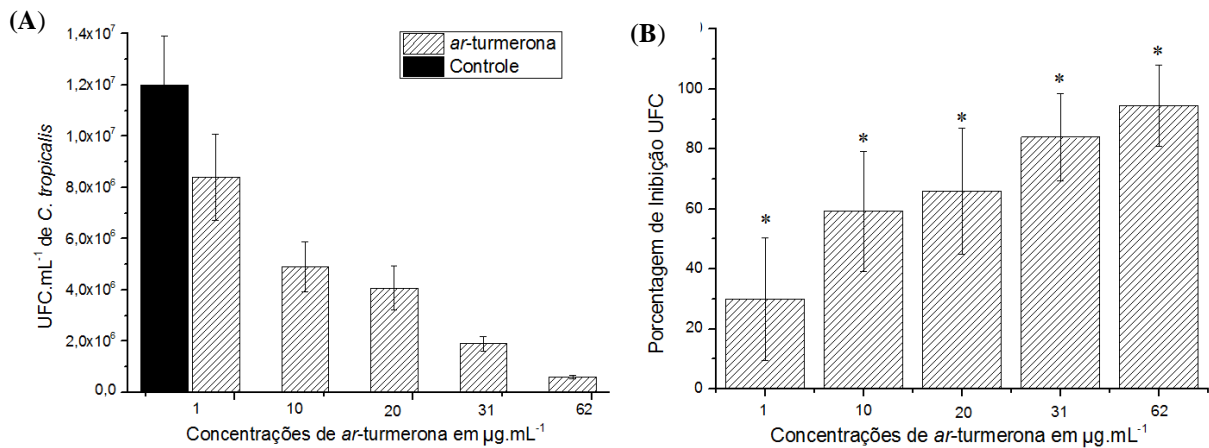
De forma oposta aos resultados desse trabalho, o estudo de Péret-Almeida et al. (2008) utilizando óleo essencial de *C. longa* sobre *C. albicans* não demonstrou suscetibilidade desse micro-organismo ao teste de disco-difusão com 45 e 90 μg de óleo/disco. Este resultado pode ser justificado pela diferença metodológica dos estudos, visto que, a metodologia padrão para ensaios antifúngicos segue, atualmente, a norma M27 do CLSI. Assim também, 4 cepas de *C. albicans*, uma de *C. tropicalis* e uma de *C. stellatoidea* não mostraram-se sensíveis a ação do óleo essencial de *C. longa* (APISARIYAKUL; VANITTANAKOM; BUDDHASUKH, 1995). Apesar da ação antifúngica de curcumina sobre *C. albicans* (NEELOFAR et al., 2011; GARCIA-GOMES et al., 2012) já ser conhecida o estudo anterior também declarou que as espécies testadas não possuíam sensibilidade frente a curcumina.

4.2.1.1 Avaliação da inibição de UFC de *Candida* spp.

A partir do plaqueamento obtivemos resultados para a contagem de UFC e a porcentagem de inibição de cada concentração de *ar-turmerona*. Conforme a leitura visual e obtenção de CIM, preconizou-se 5 concentrações de *ar-turmerona* para a realização da

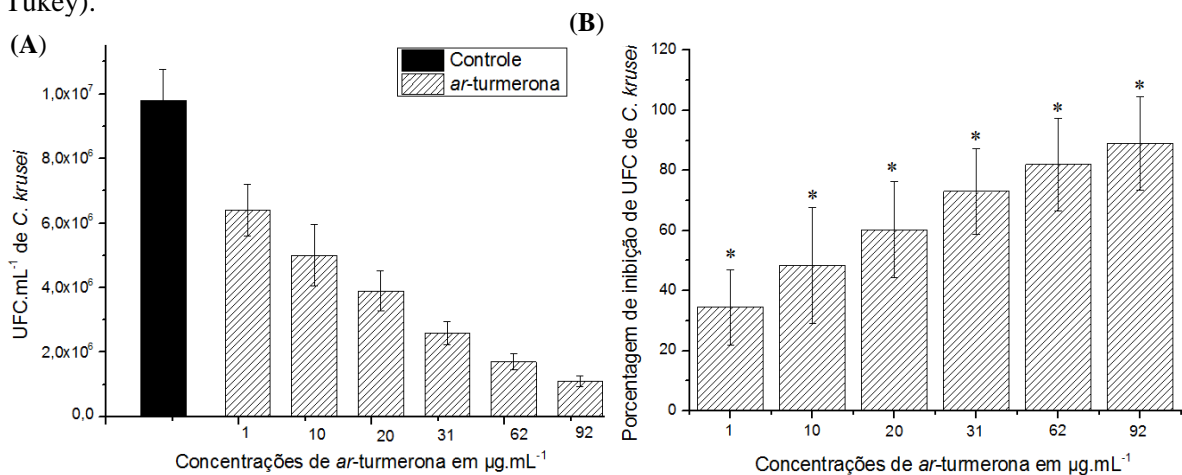
contagem de UFC de *C. tropicalis*. As concentrações testadas foram 1, 10, 20, 31 e 62 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona, resultando em inibição de 30%, 59%, 66%, 84% e 95%, respectivamente, das UFC desta cepa clínica (Figura 12).

Figura 12 - Atividade antifúngica de *ar*-turmerona sobre *C. tropicalis*: UFC.mL⁻¹ (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). * Diferença significativa entre as médias, para porcentagem de inibição de UFC entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único ($p < 0,05$); pós teste de Tukey).



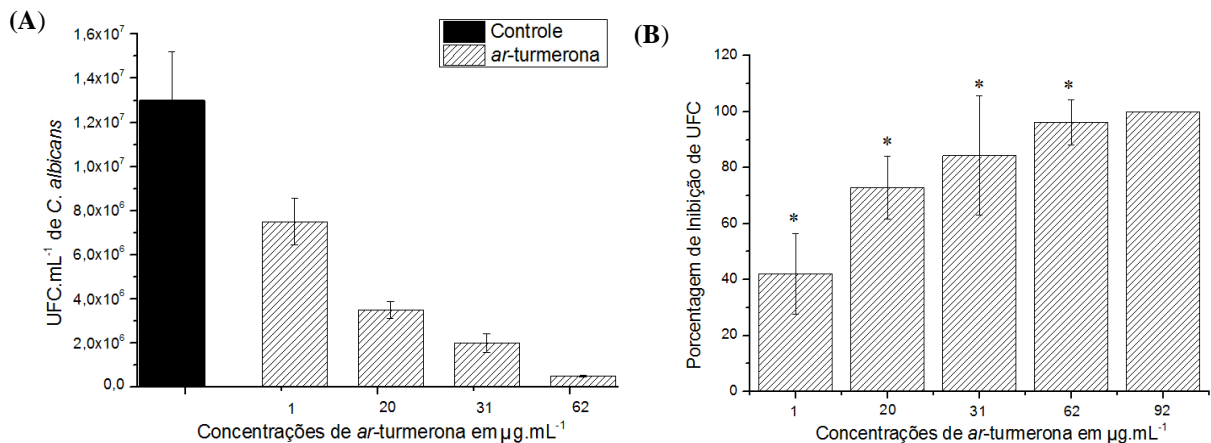
Conforme visualizado na Figura 13, a cepa de *C. krusei* ATCC 6258 apresentou um perfil de inibição de 34%, 48%, 60%, 73%, 82% e 89% das UFC para *ar*-turmerona nas concentrações de 1, 10, 20, 31, 62 e 92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Figura 13 - Atividade antifúngica de *ar*-turmerona sobre *C. krusei* ATCC 6258: UFC.mL⁻¹ (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). * Diferença significativa entre as médias, para porcentagem de inibição de UFC entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único ($p < 0,05$); pós teste de Tukey).



O plaqueamento de *C. albicans* ATCC 14053 foi realizado com 1, 20, 31 e 62 e 92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona (Figura 14), demonstrando que estas concentrações inibiram 42%, 73%, 84%, 96% e 100% das UFC, respectivamente.

Figura 14 – Atividade antifúngica de *ar*-turmerona sobre *C. albicans* ATCC 14053: UFC.mL⁻¹ (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). A concentração de 92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona não foi testada por não apresentar UFC. * Diferença significativa entre as médias, para porcentagem de inibição de UFC, entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único ($p < 0,05$); pós teste de Tukey).

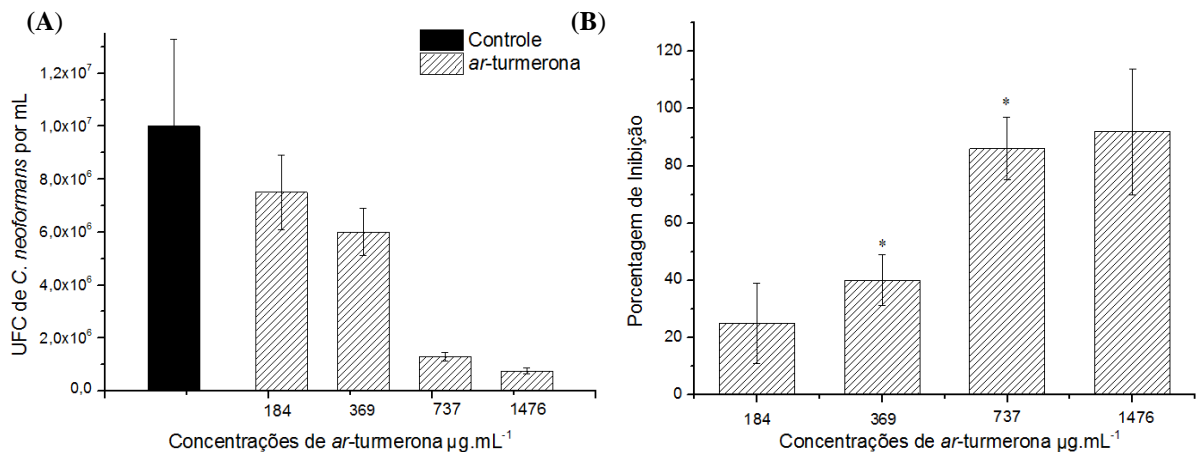


Comparando-se a inibição de UFC de *Candida* spp. observou-se que dentre as cepas testadas para esta ação de *ar*-turmerona *C. tropicalis* e *C. albicans* ATCC 14053 apresentaram a maior sensibilidade à inibição de UFC por *ar*-turmerona. Desta forma, 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiram 59% das UFC de *C. tropicalis* e 20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ inibiram 73% das UFC de *C. albicans* ATCC 14053. No entanto, a ação antifúngica de apenas 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *C. tropicalis*, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. albicans* ATCC 14053 resultou em inibição de 30%, 34,5% e 42% das UFC, respectivamente. Já a concentração de 92 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmeona resultou na total ausência de UFC para *C. albicans* ATCC 14053, assim como, a concentração fungicida mínima (menor concentração capaz de inibir totalmente o crescimento de UFC) obtida para *ar*-turmerona sobre dermatófitos que esteve entre 31,2 e 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (JANKASEM; WUTHI-UDOMLERT; GRITSANAPAN, 2013)

4.2.2 Atividade Antifúngica sobre *Cryptococcus neoformans*.

A leitura visual do CIM de *C. neoformans* após 24 h de incubação foi de $737 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona e de $0,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de anfotericina B. A partir desse dado preconizou-se os testes com 184, 369, 737 e $1476 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de *ar*-turmerona para a realização da contagem de UFC, calculou-se a porcentagem de inibição comparando-se esses valores com controle de solvente ($1.10^7 \text{ UFC.mL}^{-1}$), resultando em 25%, 40%, 86% e 92% de inibição de UFC, respectivamente para as concentrações testadas (Figura 15).

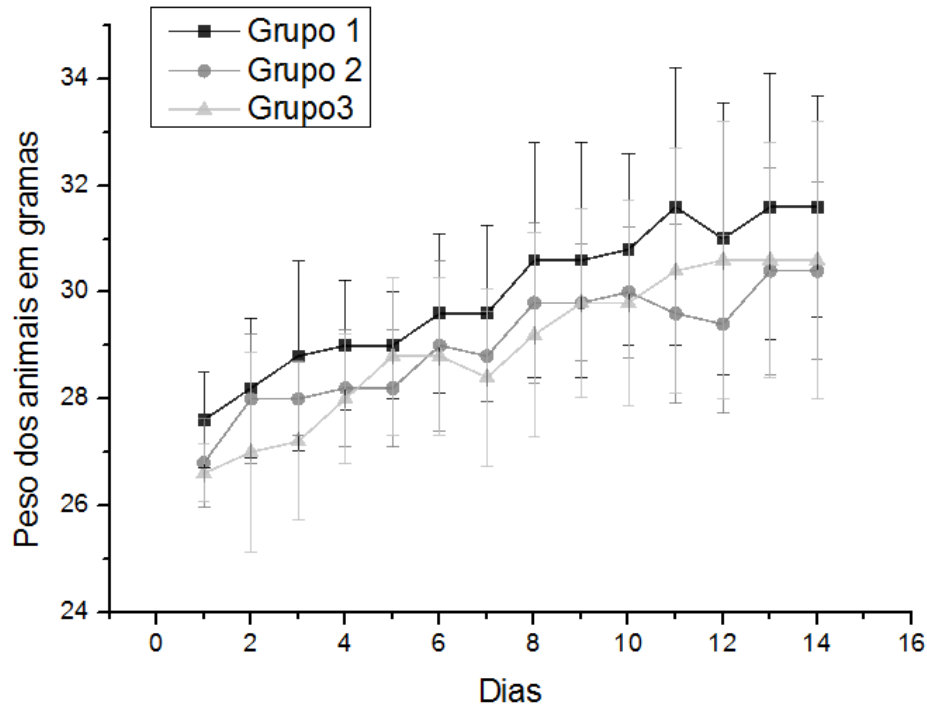
Figura 15 - Contagem de UFC de *Cryptococcus neoformans* após ensaio antifúngico com *ar*-turmerona (A) e porcentagem de inibição de UFC (B). (A) * Diferença significativa entre Controle e concentrações de *ar*-turmerona. (B) * Diferença significativa entre as concentrações de *ar*-turmerona (ANOVA-fator único ($p < 0,05$); pós teste de Tukey).



4.3 ENSAIO *in vivo*

Diversos estudos avaliam a toxicidade *in vivo* e essa análise nos períodos de 1, 14 e 35 dias classificam-se como ensaios agudo, sub-agudo e crônico, respectivamente (MAPHOSA; MASIKA; MOYO, 2010). Os dados expressos na Figura 16 representam a pesagem diária realizada individualmente, sendo então calculado os dados por grupo. Observou-se que após administração sub-aguda de *ar*-turmerona não houve variação significativa entre a massa corporal e os diferentes dias de tratamento (ANOVA-fator único ($p < 0,05$); pós teste de Tukey), este resultado demonstra que a administração oral de *ar*-turmerona não teve influência na alimentação/peso dos animais.

Figura 16 – Peso dos animais por grupo, avaliados diariamente durante 14 dias de tratamento. Grupo 1: controle administrado Tween 80 a 2%; Grupo 2: administração de *ar*-turmerona 30 mg/Kg; Grupo 3: administração dex *ar*-turmerona 60 mg/Kg.



4.3.1 Avaliação bioquímica

A análise bioquímica realizado no ensaio *in vivo* é um parâmetro útil para prever alterações no organismo decorrentes de possível dano toxicológico. Os níveis de creatinina e uréia no sangue foram medidos no intuito de identificar possíveis danos à função renal, já os marcadores enzimáticos: ALT, AST e FAL, são úteis à avaliação da função hepática. Assim, ALT e AST se alteram por dano hepatobiliar, sendo que AST estará na maioria das vezes mais alterada do que ALT. No entanto, a dosagem de FAL, em especial, demonstra um dano hepático a partir de uma colestase (WALLACH, 2003).

Os níveis plasmáticos dos marcadores analisados estão demonstrados na Tabela 6; a avaliação estatística demonstrou não haver diferença significativa entre os grupos, exceto a dosagem de fosfatase alcalina onde o Grupo 2 diferiu significativa do Grupo 1 (controle), sendo que a concentração de FAL foi menor no Grupo 2. As concentrações enzimáticas e de produtos de degradação (uréia e creatinina) no plasma dos camundongos foram consideradas normais baseada na análise do grupo controle (Grupo 1). Isto demonstra a integridade hepática e renal após 14 dias de administração de *ar*-turmerona 30 e 60 mg/Kg.

Tabela 6 – Níveis plasmáticos dos marcadores bioquímicos após o tratamento com *ar*-turmerona. Os dados estão expressos como média \pm DP (n = 5). * apresentou diferença significativa com controle (Grupo 1).

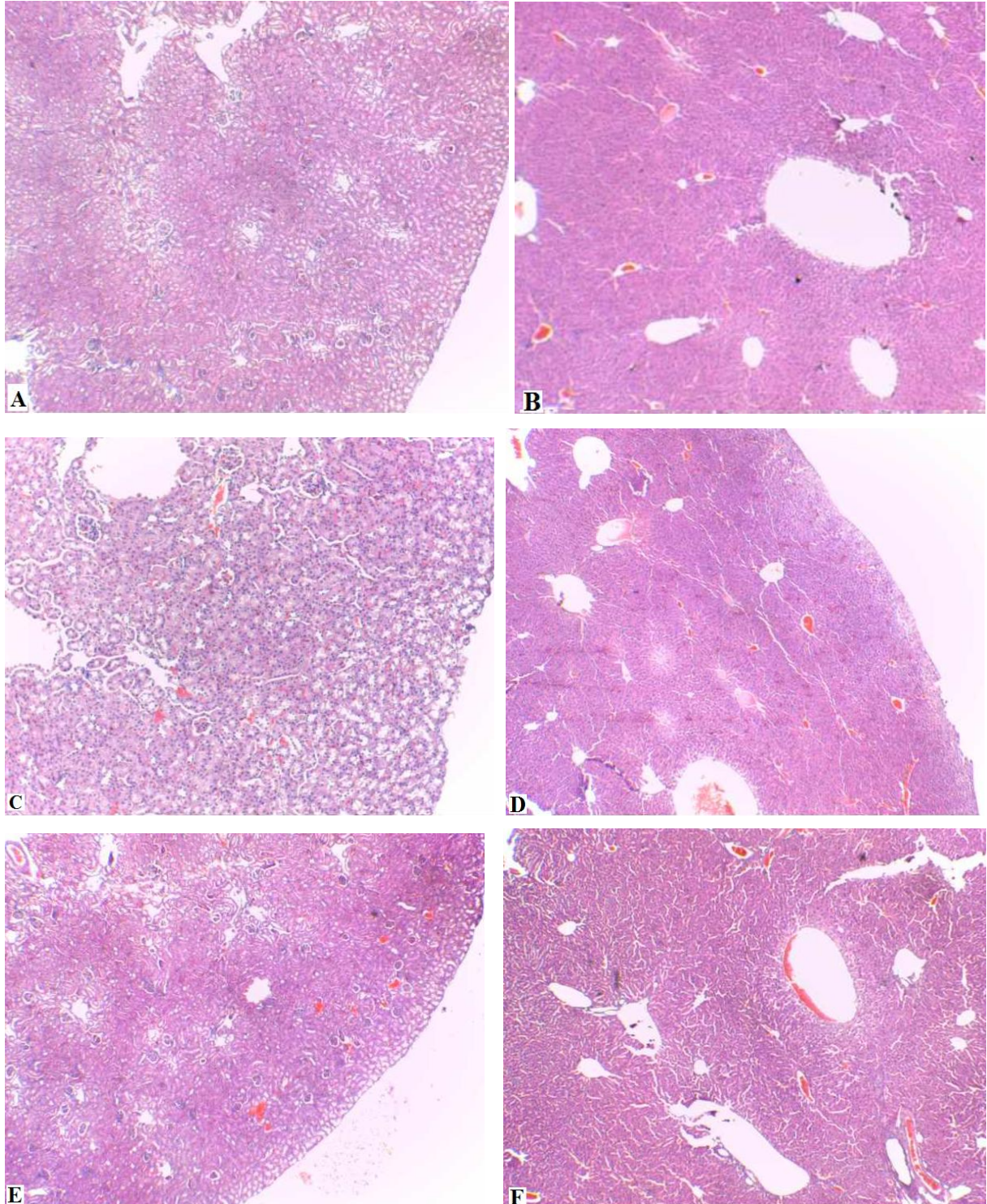
Grupo	Marcadores bioquímicos				
	Uréia (mg/dL)	Creatinina (mg/dL)	ALT (U/L)	FAL (U/L)	AST (U/L)
1	57,2 \pm 6,2	0,12 \pm 0,07	12,8 \pm 16,3	60,3 \pm 5,5	23,8 \pm 13,3
2	59,5 \pm 9,2	0,058 \pm 0,08	16,2 \pm 15,6	51,2 \pm 7,5 *	29 \pm 14
3	56,6 \pm 7,5	0,067 \pm 0,06	11,6 \pm 6,6	64,4 \pm 9,5	18,2 \pm 1,5

4.3.2 Avaliação histopatológica de camundongos Swiss

O método de análise baseou-se na inspeção do estado celular dos órgãos, comparando as lâminas dos animais pertencentes aos grupos de tratamento com *ar*-turmerona (Grupo 2 e 3) com o grupo controle (Grupo 1). Conforme Figura 17, não foram visualizadas alterações celulares nos órgãos avaliados, uma vez que, as secções de fígado e rim dos animais tratados com *ar*-turmerona mostraram-se indistinguíveis dos órgãos dos animais do grupo controle. Isto representa a inocuidade de *ar*-turmerona ao ser administrada em 30 e 60 mg/Kg por período sub-agudo.

A Figura 17 mostra os cortes histológicos de tecido hepático, demonstrando a arquitetura geral preservada, hepatócitos dispostos em traves regulares, presença de espaço-porta, número habitual de linfócitos e sem agressão a placa limitante. Os achados histológicos das lâminas de rim demonstraram parênquima renal com número adequado de glomérulos, ausência de alterações túbulo-intersticiais e alças capilares patentes.

Figura 17 - Fotomicrografias de fígados e rins de camundongos Swiss- H&E. A. Rim do Grupo 1; B. Fígado do Grupo 1. C. Rim do Grupo 2; D. Fígado do Grupo 2; E. Rim do Grupo 3. F. Fígado do Grupo 3.



O uso de modelo animal para avaliação da eficácia, segurança, farmacocinética, farmacodinâmica, entre outras aplicações é de fundamental importância na fase pré-clínica do

estudo de novas drogas. Estes ensaios permitem a classificação de substâncias de acordo com seu potencial de toxicidade ou letalidade, além de, observar eventuais efeitos adversos (VALADARES, 2006). Um dos métodos de administração padronizados é o da gavagem gástrica, mimetizando a administração oral do composto. A extrapolação de dados de eficácia e segurança em animais para os seres humanos deve ser cuidadosamente avaliada, visto que, a metodologia de administração pode influenciar a absorção, disponibilidade e efeito do composto administrado (MARTÍN-JIMÉNEZ et al., 2008).

A avaliação da segurança de *ar*-turmerona quando administrada em camundongos Swiss por até 14 dias demonstrou, a partir das análises bioquímicas e histopatológicas, valores normais se comparados ao controle, indicando o funcionamento normal do fígado e rim dos animais tratados. Assim como, a administração de *ar*-turmerona em camundongos teve como finalidade a proteção dos animais ao veneno de *Crotalus durissus terrificus* (espécie de cascavel), sendo que, *ar*-turmerona modificou o valor da dose letal 50 do veneno e preveniu a hemorragia do veneno de *Bothrops jararaca*. (FERREIRA et al., 1992). Estudo de Fase I em voluntários sadios observou após a administração de até 1 mL/dia do óleo de *C. longa* (contendo 59% de *ar*-turmerona e turmerona), por 3 meses, a ausência de alterações nos testes bioquímicos, demonstrando sua inocuidade (JOSHI, et al., 2003).

5 CONCLUSÕES

- i) *Ar-turmerona* demonstrou atividade citotóxica sobre células da linhagem HEp-2, HeLa e HRT-18 ao observarmos a reação de redução de MTT e análise morfológica.

- ii) A avaliação da suscetibilidade de espécies de *Candida* spp. resultou na ação antifúngica de *ar-turmerona*.

- iii) A análise *in vivo*, a partir de parâmetros bioquímicos e anatomopatológicos, revelou a segurança de *ar-turmerona* quando administrada por até 14 dias via gavagem gástrica em camundongos Swiss.

6 REFERÊNCIAS

- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. *Effect of Plant Oils on Candida albicans*. Journal of Microbiology, Immunology and Infection, v.43, n.5, p.447–451, 2010.
- 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, n.1, p.40–59, 2009.
- ALMIRANTE, B.; RODRIGUEZ, D.; PARK, B.J.; CUENCA-ESTRELLA, M.; PLANES, A.M.; ALMELA, M.; MENSA, J.; SANCHEZ, F.; AYATS, J.; GIMENEZ, M.; SABALLS, P.; FRIDKIN, S.K.; MORGAN, J.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; WARNOCK, D.W.; PAHISSA, A.; *Barcelona Candidemia Project Study Group*. *Epidemiology and Predictors of Mortality in Cases of Candida Bloodstream Infection: Results from Population-Based Surveillance, Barcelona, Spain, from 2002 to 2003*. Journal of Clinical Microbiology, v.43, n.4, p.1829–1835, 2005.
- ANDES, D.R.; SAFDAR, N.; BADDLEY, J.W.; PLAYFORD, G.; REBOLI, A.C.; REX, J.H.; SOBEL, J.D.; PAPPAS, P.G.; KULBERG, B.J. *Impacto f Treatment Strategy on Outcomes in Patient with Candidemia and other forms of Invasive Candidiasis: A patient-level Quantitative review of Randomized trials*. Clinical Infectious Diseases, v.54, n.8, p. 110-22, 2012.
- APISARIYAKUL, A.; VANITTANAKOM, N.; BUDDHASUKH, D. *Antifungal activity of turmeric oil extracted from Curcuma longa (Zingiberaceae)*. Journal of Ethnopharmacology, v.49, p.163-169, 1995.
- ARATANEHEMUGE, Y.; KOMIYA, T.; MOTEKI, H.; KATSUZAKI, H.; IMAI, K.; HIBASAMI, H. *Selective induction of apoptosis by ar-turmerone isolated from turmeric (Curcuma longa L) in two human leukemia cell lines, but not in human stomach cancer cell line*. International Journal of Molecular Medicine, Japan, v.9, n.5, p.481-484, 2002. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/ijmm/9/5/481>>. Acessado em: 23 maio 2012.

BELANGER, J.T. *Perillyl alcohol: applications in oncology*. *Alternative Medicine Review*, v.3, n.6, p.448-57, 1998.

BERGERS, G.; HANAHAN, D.; COUSSENS, L.M. *Angiogenesis and apoptosis are cellular parameters of neoplastic progression in transgenic mouse models of tumorigenesis*. *The International Journal of Developmental Biology*, USA, v.42, p.995-1002, 1998.

BERTO, R.F. *Ação antifúngica dos peptídeos leptoctinas-1 e -2 isolados da secreção da pele de rã sul-americana *Leptodactylus pentadactylus**. 2010, f. 98. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza.

BHAVANANI, S.M.; BALLOW, C.H. *New agents for Gram-positive bacteria*. *Current Opinion in Microbiology*, v.13, p.528-534, 1992.

BODGER, K. *Colorectal cancer*. *J Royal College of Physicians of London*, v.34, n.2, p.197-201, 2000.

BOGO D. *Avaliação in vitro da atividade antineoplásica de ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural*. 2009. 67 f. Dissertação – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

BUCKINGHAM, J. *Dictionary of Natural Products*. Chapman and Hall: London, 1994.

CARRILLO-MUÑOZ, A.J.; GIUSIANO, G.; EZKURRA, P.A.; QUINDÓS, G. *Antifungal agents: Mode of action in yeast cells*. *Revista Española de Quimioterapia*, Bilbao, v.19, n.2, p.130-139, 2006.

CARMICHAEL, J.; DEGRAFF, W. G.; GAZDAR, A. F.; MINNA, J. D.; MITCHELL, J. B. *Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing*. *Cancer Research*, v.47, n.4, p.936-942, 1987.

CASADEVALL, A.; PERFECT, J.R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC: ASM Press., 1998.

CASADEVALL, A.; PIROFSKI, L-A. *Host-Pathogen Interactions: The Attributes of Virulence*. *The Journal of Infectious Diseases*, v.184, p.337–344, 2001. Disponível em: <<http://jid.oxfordjournals.org/content/184/3/337.full>>. Acessado em: 4 de mar de 2013.

CASTRO, J. A. *Toxicologia básica: mecanismos de toxicidade y sus aplicaciones*. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana, v.2, p.197-206, 1993.

CHAINANI-WU, N. *Safety and anti-inflammatory activity of curcumin: a component of tumeric (Curcuma longa)*. Journal of Alternative and Complementary Medicine, v.9, n.1, p.161-8, 2003. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12676044>>. Acessado em 26 de mar de 2013.

CHAPMAN, S.W.; SULLIVAN, D.C.; CLEARY, J.D. *In search of the holy grail of antifungal therapy*. Transactions of the American Clinical and Climatological Association. v.119, p.197-215, 2008.

CHATTOPADHYAY, I., BISWAS, K., BANDYOPADHYAY, U., BANERJEE, R.K. *Turmeric and curcumin: biological actions and medicinal applications*. Current Science, v.87, p.44–53, 2004.

CHESON, B.D. *Infectious and immunosuppressive complications of purine analog therapy*. Journal of Clinical Oncology, v.13, p.2431–2448, 1995.

CHENG SB, WU LC, HSIEH YC, WU CH, CHAN YJ, CHANG LH, CHANG CM, HSU SL, TENG CL, WU CC. *Supercritical carbon dioxide extraction of aromatic turmerone from Curcuma longa Linn. induces apoptosis through reactive oxygen species-triggered intrinsic and extrinsic pathways in human hepatocellular carcinoma HepG2 cells*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.60, n.38, p.9620-30, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22946656>>. Acessado em abr de 2013.

CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada – M27-A2*. 2ª ed., Wayne, v. 22, n.15, 2002.

COLOMBO, A.L.; NUCCI, M.; PARK, B.J.; NOUER, S.A.; ARTHINGTON-SKAGGS, B.; DA MATA, D.A.; WARNOCK, D.; MORGAN, J. *Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in eleven medical centers*. Journal Clinical Microbiology, v.44, n.8, p.2816-2823, 2006. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1594610/>>. Acessado em: 25 de fev. de 2013.

CRABTREE, J.N.; OKAGAKI, L.H.; WIESNER, D.L.; STRAIN, A.K.; NIELSEN, J.N.; NIELSEN, K. *Titan cell production enhances the virulence of Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity, v.80, n.11, p.3776-3785, 2012. Disponível em: <<http://iai.asm.org/content/early/2012/08/09/IAI.00507-12.full.pdf+html>>. Acessado em: 15 de out. de 2012.

CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. *Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions*. Expert Opinion on Investigational Drugs, v.9, p.1–15, 2000.

CUNNINGHAM, D.; ATKIN, W.; LENZ, H.J.; LYNCH, H.T.; MINSKY, B.; NORDLINGER, B.; STARLING, N. *Colorectal cancer*. The Lancet, v.375, p.1030-47, 2010.

CURTO, M.; COLE, B.K.; LALLEMAND, D.; LIU, C-H.; MCCLATCHEY, A.I. *Contact-dependent inhibition of EGFR signaling by Nf2/Merlin*. The Journal of Cell Biology, v.177, n.5, p.893–903, 2007.

DENIZOT, F.; LANG, R. *Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. Modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability*. Journal of Immunological Methods, v.89, n.2, p.271-277, 1986.

DOHARE, P.; VARMA, S.; RAY, M. *Curcuma oil modulates the nitric oxide system response to cerebral ischemia/reperfusion injury*. Nitric Oxide, v.19, p.1–11, 2008.

DRUGFUTURE. Disponível em: <<http://www.drugfuture.com/chemdata/ar-turmerone.html>>. Acessado em: maio de 2013.

ENWURU, C.A.; OGUNLEDUN, A.; IDIKA, N.; ENWURU, N.V.; OGBONNA, F.; ANIEDOBE, M.; ADEIGA, A. *Fluconazole resistant opportunistic oro-pharyngeal candida and non-candida yeast-like isolates from HIV infected patients attending ARV clinics in Lagos, Nigéria*. African Health Sciences, Nigeria, v.8, n.3, 2008.

EUCAST - European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing. Definitive Document Edef 7.2 Revision. *Method for the determination of broth dilution minimum Inhibitory concentrations of antifungal agents for yeasts*.

FERREIRA, L.A.F., HENRIQUES, O.B., ANDREONI, A.A.S.; VITAL, G.R.F.; CAMPOS, M.M.C.; HABERMEHL, G.G.; MORAES, V.L.G. *Antivenom and biological effects of ar-turmerone isolated from Curcuma longa (Zingiberaceae)*. *Toxicon*, v.30, p.1211–1218, 1992.

FERNANDES, J.; DA FONSECA, C.O.; TEIXEIRA, A.; GATTASS, C.R. *Perillyl alcohol induces apoptosis in human glioblastoma multiforme cells*. *Oncology Reports*, v.13, p.943-7, 2005.

FRESHNEY, R. I. *Culture of animal cells*. New York: Wiley-Liss Inc., p.486, 1994.

GARCIA-GOMES, A.S.; CURVELO, J.A.R.; SOARES, R.M.A.; FERREIRA-PEREIRA, A. *Curcumin acts synergistically with fluconazole to sensitize a clinical isolate of Candida albicans showing a MDR phenotype*. *Medical Mycology*, v.50, n.1, p.26-32, 2012.

GHANNOUM, M.A. *Candida: a causative agent of an emerging infection*. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*, v.6, p.188–196, 2001.

GIANTONIO, B.J.; CATALANO, P.J.; MEROPOL, N.J.; O'DWYER, P.J.; MITCHELL, E.P.; ALBERTS, S.R. *Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer: results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200*. , v. 25, n.12, p.1539-44, abr 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17442997>>. Acessado em: jun de 2013.

GOLDMAN, M.; CLOUD, G.A.; SMEDEMA, M.; LEMONTE, A.; CONNOLLY, P.; MCKINSEY, D.S.; KAUFFMAN, C.A.; MOSKOVITZ, B.; WHEAT, L.J.; THE NATIONAL INSTITUTE OF ALLERGY AND INFECTIOUS DISEASES MYCOSES STUDY GROUP. *Does long-term itraconazole prophylaxis result in in vitro azole resistance in mucosal Candida albicans isolates from persons with advanced human immunodeficiency virus infection?* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.44, p.1585–1587, 2000. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC89917/>. Acessado em: 30 de out. de 2012.

GOLDSBY, R.A.; KINDT, T.J.; OSBORNE, B.A. *KUBY imunologia*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002, p.539-540.

GONZÁLEZ-HEIN, G.; GONZÁLEZ-HEIN, J.; JARABRÁN, M.C.D. *Isolation of Cryptococcus neoformans in dry droppings of captive birds in Santiago, Chile*. Journal of Avian Medicine and Surgery, v.24, n.3, 2010.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. *The Hallmarks of Cancer. Review*. Cell, v.100, p.57–70, 2000.

HARRISON, M. A.; RAE, I. F. *General techniques of cell culture*. New York: Cambridge University Press, p.162, 1997.

HEITMAN, J., KOZEL, T.; KWON-CHUNG, J.; PERFECT, J.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus: from human pathogen to model yeast*. ASM Press, Washington D.C., p.620, 2011.

INNOCENTI, F. C.; OCARES, M.U.; SANTANDER, C.A.; HINRICHS, E.O.; LYNCH, O.G.; MARTIN, F.Q.; LEDERMANN, C.S.; ROSS, E.S. *Manejo de enfermedad hepática metastásica colorrectal bilateral: Colectomía y hepatectomía multi-etapas: Experiencia inicial*. Revista Chilena de Cirugía. v.62, n.6, p.587-593, 2010.

JANKASEM, M.; WUTHI-UDOMLERT, M.; GRITSANAPAN, W. *Antidermatophytic Properties of Ar-Turmerone, Turmeric Oil, and Curcuma longa Preparations*. ISRN Dermatology, p.3, 2013.

JASS, J.R. *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. Histopathology, v.50, p.223-30, 2007.

JAYAPRAKASHA, G.K.; RAO, L.J.M.; SAKARIAH, K.K. *Chemistry and biological activities of C. longa*. Trends in Food Science & Technology, v.16, p.533–548, 2005.

JI, M.J.; CHOI, J.; LEE, J.; LEE, Y. *Induction of apoptosis by ar-turmerone on various cell lines*. International Journal of Molecular Medicine, v.14, n.2, p.253-256, 2004. Disponível em: <http://garfield.library.upenn.edu/histcomp/ourisson-g_citing/node/6225.html>. Acessado em: 15 de maio de 2012.

JOSHI, J.; GHASAS, S.; VAIDYA, A.; VAIDYA, R.; KAMAT, D.V.; BHAGWAT, A.N.; BHIDE, S. *Early Human Safety Study of Turmeric Oil (Curcuma longa oil) administered*

orally in healthy volunteers. *Journal of the Association of Physicians of India*, v.51, p.1055-1060, 2003.

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.

KIM, D.; SUH, Y.; LEE, H.; LEE, Y. *Immune activation and antitumor response of ar-turmerone on P388D1 lymphoblast cell implanted tumors*. *International Journal of Molecular Medicine*, v.31, n.2, p.386-92, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23229920>>. Acessado em: 26 de mar. de 2013.

KONG, Y.; MA, W.; LIU, X.; ZU, Y.; FU, Y.; WU, N.; LIANG, L.; YAO, L.; EFFERTH, T. *Cytotoxic Activity of Curcumin towards CCRF-CEM Leukemia Cells and Its Effect on DNA Damage*. *Molecules*, v.14, p.5328-5338, 2009.

LAGUNA, F.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; POLO, R.; VALENCIA, E.; DIAZ-GUERRA, T.M.; DRONDA, F.; PULIDO, F. *Patterns of fluconazole susceptibility in isolates from human immunodeficiency virus-infected patients with oropharyngeal candidiasis due to Candida albicans*. *Clinical Infectious Disease*, v.24, p.124–130, 1997.

LEE, H.S., SHIN, W.K., SONG, C., CHO, K.Y., AHN, Y.J. *Insecticidal activities of ar-turmerone identi Wed Curcuma longa L. rhizome against Nilaparvata lugens (Homoptera: Delphacidae) and Plutella xyostella (Lepidoptera: Yponomeutidae)*. *Journal of Asia-Pacific Entomology*, v.4, p.181–185, 2001.

LEE, H.S.; CHOI, K.J.; CHO, K.Y.; AHN, Y.J. *Fungicidal Activity of ar-Turmerone Identified in Curcuma longa Rhizome against Six Phytopathogenic Fungi*. *Agricultural Chemistry & Biotechnology, Korea*, v.46, n.1, p.25-28, dez. 2003.

LEE, Y-K. *Activation of apoptotic protein in U937 cells by a component of turmeric oil*. *BMB reports*, v.42, n.2, p.96-100, 2009. Disponível em: <<http://koreascience.or.kr/article/ArticleFullRecord.jsp?cn=JAKO200910103425990>>. Acessado em: 24 de set. de 2012.

MAPHOSA, V.; MASIKA, P.J.; MOYO, B. *Toxicity evaluation of the aqueous extract of the rhizome of Elephantorrhiza elephantina (Burch.) Skeels. (Fabaceae), in rats.* Food and Chemical Toxicology, v.48, n.1, p.196-201, 2010.

MARTIN, G.S.; MANNINO, D.M.; EATON, S.; MOSS M. *The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000.* The New England Journal of Medicine, v.348, p.1546-54, 2003. Disponível em: <<http://www.medcenter.com/medscape/content.aspx?id=5551&langtype=1046>>. Acessado em: 12 de abr. de 2012.

MARTIN, M.V. *The use of fluconazole and itraconazole in the treatment of Candida albicans infections: a review.* Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v.44, p.429-437, 1999.

MARTÍN-JIMÉNEZ, T.; LINDEBLAD, M.; KAPETANOVIC, I.M.; CHENB, Y.; LYUBIMOV, A. *Comparing pharmacokinetic and pharmacodynamic profiles in female rats orally exposed to lovastatin by gavage versus diet.* Chemico-Biological Interactions, v.171, p.142–151, 2008.

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.

MELO, M.M.; HABERMEHL, M.M.; OLIVEIRA, N.J.F.; NASCIMENTO, E.F.; SANTOS, M.B.; LÚCIA, M. *Treatment of Bothrops alternatus envenomation by Curcuma longa and Calendula officinalis extracts and ar-turmerone.* Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, Afenas, v.57, n.1, p.7-17, 2005.

MENON, V.P.; SUDHEER, A.R. *Antioxidant and anti-inflammatory properties of curcumin.* Advances in Experimental Medicine and Biology, v.595, p.105-25, 2007.

MÍMICA, L.M.J.; UEDA, S.M.Y.; MARTINO, M.D.V.; NAVARINI, A.; MARTINI, I.J. *Diagnóstico de infecção por Candida: avaliação de testes de identificação de espécies e caracterização do perfil de suscetibilidade.* Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial, v.45, n.1, p.17-23, fev. 2009.

MIURA, K.; NAKANO, H.; SAKURAI, J.; KOBAYASHI, S.; KOIZUMI, S.; ARAI, T.; SHIMAMURA, T.; MAKIZUMI, R.; YAMADA, K.; MIYAJIMA, N.; OTSUBO, T.; KOIKE, J. *Splenomegaly in FOLFOX-naïve stage IV or recurrent colorectal cancer patients due to chemotherapy-associated hepatotoxicity can be predicted by the aspartate aminotransferase to platelet ratio before chemotherapy*. International Journal of Clinical Oncology. Japan, v.16, n.3, p.257-63, 2011.

MOTTA, A.L.; ALMEIDA, G.M.D.; ALMEIDA, J.N.; BURATTINI, M.N. *Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex*. The Brazilian Journal Infectious Disease, São Paulo, v.14, n.5, p.441-448, 2010.

MURAKAMI, A.; FURUKAWA, I.; MIYAMOTO, S.; TANAKA, T.; OHIGASHI, H. *Curcumin combined with turmerones, essential oil components of turmeric, abolishes inflammation-associated mouse colon carcinogenesis*. BioFactors, v.39, n.2, p.221-32, 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23233214>>. Acessado em 26 de mar. de 2013.

NATIONAL FOUNDATION FOR CANCER RESEARCH - NFCR. Disponível em: <<https://www.nfcr.org/colon-cancer>>. Acessado em 25 de mar de 2013.

NAGHETINI, C.C. *Caracterização físico-química e atividade antifúngica dos óleos essenciais da Cúrcuma*. 2006. 61 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NAZ, S.; ILYAS, S.; PARVEEN, Z.; JAVED, S. *Chemical analysis of essential oils from turmeric (Curcuma longa) rhizome through GC-MS*. Asian Journal Chemistry. v.22, p.3153-3158, 2010.

NEGI PS, JAYAPRAKASHA GK, JAGAN MOHAN RAO L, SAKARIAH KK. *Antibacterial activity of turmeric oil: a by product from curcumin manufacture*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.47, n.10, p.4297-300, 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10552805>>. Acessado em 29 de abr. de 2013.

NEELOFAR, K.; SHREAZ, S.; RIMPLE, B.; MURALIDHAR, S.; NIKHAT, M.; KHAN, L.A. *Curcumin as a promising anticandidal of clinical interest*. Canadian Journal of Microbiology, v. 57, n. 3, p.204-210, 2011.

NEWMANN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADE, K.M. *Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002*. Journal of Natural Products, v.66, p.1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, C. S.; MESQUITA, G.M.; PETACCI, F.; FREITAS, S. S.; MORENO, M. I. C.; CARDOSO, E.; LIÃO L. M. *Ar-turmerona, sesquiterpeno responsável pela atividade alelopática de Curcuma longa*. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32. 2009, Fortaleza. Livro de resumos, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2009.

OLIVEIRA, C. S.; TAVARES, W. S; PETACCI, F.; MORENO, M. I. C.; FREITAS, S. S. *Atividade fitotóxica e isolamento do sesquiterpeno ar-turmerona de Curcuma longa L. (Zingiberaceae)*. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2010, Ribeirão Preto. Anais do XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, 2010.

PARK, B.J.; WANNEMUEHLER, K.A.; MARSTON, B.J.; GOVENDER, N.; PAPPAS, P.G.; CHILLER, T.M. *Estimation of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS*. AIDS, v.23, p.525-530, 2009.

PARK, S.Y.; JIN, M.L.; KIM, Y.H.; KIM, Y.H.; LEE, S.J. *Aromatic-turmerone inhibits α -MSH and IBMX-induced melanogenesis by inactivating CREB and MITF signaling pathways*. Archives for Dermatology Research, v.303, p.737–744, 2011.

PARK, S.Y.; JIN, M.L.; KIM, Y.H.; KIM, Y.H.; LEE, S.J. *Anti-inflammatory effects of aromatic-turmerone through blocking of NF- κ B, JNK, and p38 MAPK signaling pathways in amyloid β -stimulated microglia*. International Immunopharmacology, Korea, v.14, p.13–20, 2012^a.

PARK, S.Y.; KIM, Y.H.; KIM, Y.H.; LEE, S.J. *Aromatic-turmerone attenuates invasion and expression of MMP-9 and COX-2 through inhibition of NF- κ B activation in TPA-induced breast cancer cells*. Journal of Cellular Biochemistry, v.113, n.12, p.3653–3662, 2012^b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22740037>>. Acessado em 26 mar. 2013.

PATEL, R. *Antifungal agentes. Part I. Amphotericin B preparations and flucytosine*. Mayo Clinical Proceedings, v.73, p.1205-1225, 1998.

PEDROSO, L.S.; FÁVERO, G.M.; CAMARGO, L.E.A.; MAINARDES, R.M.; KHALIL, N.M. *Effect of the o-methyl catechols apocynin, curcumin and vanillin on the cytotoxicity activity of tamoxifen*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, v.28, n.4, p.734-40, 2013.

PÉRET-ALMEIDA, L.; NAGHETINI, C.C.; NUNAN, E.A.; JUNQUEIRA, R.G.; GLÓRIA, M.B.A. *In vitro antimicrobial activity of the ground rhizome, curcuminoid pigments and essential oil of Curcuma longa L.* Ciência e Agrotecnologia., Lavras, v.32, n.3, p.875-881, 2008.

PIROFSKI, L-A.; CASADEVALL, A. *Cryptococcus neoformans: Paradigm for the Role of Antibody Immunity Against Fungi?* Zentralblatt fur Bakteriologie, v.284, p.475-495, 1996.

PORFIRIO, Z.; MELO-FILHO, G.C.; ALVINO, V.; LIMA, M.R.F.; SANT'ANA, A.E.G. *Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de Lafoensia pacari A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar*. Revista brasileira de Farmacognosia, v.19, n.3, p.785-789. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000500023&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acessado em: 16 de ago. de 2012.

PORTAL SAÚDE – SUS. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30780> Acessado em: 23 de setembro de 2012.

POSSE, J.C. *Plantas medicinais utilizadas pelos usuários do sus nos bairros de paqueta e santa teresa: uma abordagem etnobotânica*. 2007. 115 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

PRAKASH, P.; MISRA, A.; SURIN, W.R.; JAIN, M.; BHATTA, R.S.; PAL, R.; RAJ, K.; BARTHWAL, M.K.; DIKSHIT, M. *Anti-platelet effects of Curcuma oil in experimental models of myocardial ischemia-reperfusion and thrombosis*. Thrombosis Research, v.127, p.111–118, 2011.

RAVEENDRAN, R.; BHUVANESHWAR, G.S.; SHARMA, C.P. *In vitro cytotoxicity and cellular uptake of curcumin-loaded Pluronic/Polycaprolactone micelles in colorectal adenocarcinoma cells*. Journal of Biomaterials Applications, v.24, 2012. Disponível em:

<<http://jba.sagepub.com/content/early/2011/11/09/0885328211427473.abstract>>. Acessado em 26 de mar. de 2013.

ROTH, G.H.; CHANDRA, A.; NAIR, M.G. *Nobel bioactivities of Curcuma longa constituents*. Journal of Natural Products, v.61, n.4, p.542-5, 1998.

ROUHI, A.M; WASHINGTON, C. *Rediscovering natural products*. Chemical & Engineering News, v.81, n.41, p.77-91, 2003.

RUBBIA-BRANDT, L.; AUDARD, V.; SARTORETTI, P.; ROTH, A.D.; BREZAULT, C.; LE CHARPENTIER, M.; DOUSSET, B.; MOREL, P.; SOUBRANE, O.; CHAUSSADE, S.; MENTHA, G.; TERRIS, B. *Severe hepatic sinusoidal obstruction associated with oxaliplatin-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer*. Annals of Oncology, v.15, p.460-466, 2004.

SANDOUK, F.; JERF, F.A.; AL-HALABI, B. Review article: *Precancerous Lesions in Colorectal Cancer*. Gastroenterology Research and Practice, Síria, p.1-11, 2013.

SARWAR, M.; ATTITALLA, I.H.; ABDOLLAHI, M. *A review on the recente advances in pharmacological studies on Medicinal Plants; animal studies are done but clinical studies needs completing*. Asian Journal of Animal and Veterinary Advances, v.6, n.8, p.867-883, 2011.

SCHOR, N.F. *Pharmacotherapy for Adults with Tumors of the Central Nervous System*. Pharmacology & Therapeutics, New York, v.121, n.3, p.253–264, 2009.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, pg 37^a.

SIDRIM, J.J.C; ROCHA, M.F.G. *Micologia médica à luz de autores contemporâneos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, pg 35^b.

SIGRIST, M.S. *Divergência Genética Em Curcuma longa L. utilizando marcadores microsatélites e agromorfológicos*. 2009, f. 82. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical) – Instituto Agrônômico, São Paulo.

SILVA, P. *Farmacologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994, p.1145-46.

SINGH, G.; SINGH, O.P.; MAURYA, S. *Chemical and biocidal investigations on essential oils of some Indian Curcuma species*. Progress in Crystal Growth and Characterization of Materials., v.45, p.75-81, 2002.

TAN, K.; BRAYSHAW, N.; TOMASZEWSKI, K.; TROKE, P.; WOOD, N. *Investigation of the potential relationships between plasma voriconazole concentrations and visual adverse events or liver function test abnormalities*. The Journal of Clinical Pharmacology, v.46, p.235–243, 2006.

TAVARES, W.S.; SILVA, I.M.; OLIVEIRA, C.S.; PETACCI, F.; FREITAS, S.S.; MORENO, M.I.C. *Atividade fitotóxica e isolamento do sesquiterpeno ar-turmerona de Curcuma longa L. (Zingiberaceae)*. In: XXVII Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas. 19 a 23 de julho de 2010 - Centro de Convenções - Ribeirão Preto – SP.

TAVARES, W.S.; FREITAS, S.S.; GRAZZIOTTI, G.H.; PARENTE, L.M.L.; LIÃO, L.M.; ZANUNCIO, J.C. *Ar-turmerone from Curcuma longa (Zingiberaceae) rhizomes and effects on Sitophilus zeamais (Coleoptera: Curculionidae) and Spodoptera frugiperda (Lepidoptera: Noctuidae)*. Industrial Crops and Products, v. 46, p.158– 164, 2013.

TAKEUCHI, A.P. *Caracterização antimicrobiana de componentes do açafrão (Curcuma longa L.) e elaboração de filmes ativos com montmorilonita e óleo resina de açafrão*. Universidade federal de goiás.- 59f. Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos- Goiânia, 2012.

TUMBARELLO, M.; POSTERARO, B.; TRECARCHI, E.M.; FIORI, B.; ROSSI, M.; PORTA, R.; DONATI, K.G.; SORDA, M.; SPANU, T.; FADDA, G.; CAUDA, R.; SANGUINETTI, M. *Biofilm Production by Candida Species and Inadequate Antifungal Therapy as Predictors of Mortality for Patients with Candidemia*. Journal of Clinical Microbiology, v.45, n.6, p.1843–1850, 2007.

VALADARES, M.C. *Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “era do teste dl50”*. Revista Eletrônica de Farmácia, v. 3, n.2, p. 93-98, 2006.

VAN CRUCHTEN, S. AND VAN DEN BROECK, W. *Morphological and Biochemical Aspects of Apoptosis, Oncosis and Necrosis*. Anatomia, Histologia, Embryologia, v.31, p. 214–223, 2002.

VAN DER MEER, F.J.; FABER, D.J.; AALDERS, M.C.G.; POOT, A.A.; VERMES, I.; VAN LEEUWEN, T.G. *Apoptosis and necrosis induced changes in light attenuation measured by optical coherence tomography*. *Lasers in Medical Science*, v.25, p.259–267, 2010

VIJAN, S.; INADOMI, J.; HAYWARD, R.A.;HOFER, T.P.; FENDRICK, A.M. *Profections of demand and capacity for colonoscopy related to increasing rates of colorectal cancer screening in the United States*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, v.20, n.5, p.507-15, 2004.

WALLACH, J. *Interpretação de Exames Laboratoriais*. 7.ed. Rio de Janeiro: Medsi – Guanabara Koogans, 2003, p. 86-88.

WARRIER, S.K.; KALADY, M.F. *Familial Adenomatous Polyposis: Challenges and Pitfalls of Surgical Treatment*. *Clinic in Colon and Rectal Surgery*, v.25, n.2, p.83–89, 2012.

WILSON, L.S.; REYES, C.M.; STOLPMAN, M.; SPECKMAN, J.; ALLEN, K.; BENEY, J. *High Costs of Systemic Fungal Infections*. *Value In Health*, v.5, n.1, p.26-34, 2002.

WINN, W.Jr.; ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. *Koneman, diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.1147^a.

WINN, W.Jr., ALLEN, S.; JANDA, W.; KONEMAN, E.; PROCOP, G.; SCHRECKENBERGER, P.; WOODS, G. *Koneman, diagnóstico microbiológico: Texto e Atlas colorido*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008, p.1217^b.

WU, J.; WEN, H. *Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on Candida albicans*. *Journal of Medical Colleges of PLA, China*, v.24, p.142–147, 2009.

WYLLIE, A.H.; KERR, J.F.; CURRIE, A.R. *Cell death: the significance of apoptosis*. *International Review Cytology*. v.68, p.251-306, 1980.

YANG, Y.; LI, H.; HOU, S.; HU, B.; LIU, J.; WANG, J. *The Noncoding RNA Expression Profile and the Effect of lncRNA AK126698 on Cisplatin Resistance in Non-Small-Cell Lung Cancer Cell*. PLOS ONE, China, v.8, n.5, p.1-12, maio 2013.

ZARAGOZA, O.; ALVAREZ, M.; TELZAK, A.; RIVERA, J.; CASADEVALL, A. *The Relative Susceptibility of Mouse Strains to Pulmonary Cryptococcus neoformans Infection Is Associated with Pleiotropic Differences in the Immune Response*. Infection and immunity, v.75, n.6, p.2729–2739, 2007.

ZAOUTIS, T.E.; ARGON, J.; CHU, J.; BERLIN, J.A.; WALSH, T.J.; FEUDTNER, C. *The Epidemiology and Attributable Outcomes of Candidemia in Adults and Children Hospitalized in the United States: A Propensity Analysis*. Clinical Infectious Diseases, v.41, p.1232–1239, 2005.

ZHANG, A.; RAJANBABU, T.V. *Chiral Benzyl Centers through Asymmetric Catalysis. A Three-Step Synthesis of (R)-(-)-Curcumene via Asymmetric Hydrovinylation*. Organic Letters, v.6, n.18, p.3159-3161, 2004.

ANEXO**ANEXO 1 – Aprovação pela Comissão de Ética em experimentação animal (CEEA) da UNICENTRO**