

PAULA DE SOUSA E CASTRO

**Avaliação *in vitro* da atividade de óleos essenciais
sobre *Candida auris***

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires

Coorientadora: Profa. Dra. Patrícia de Souza Santos

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de
Controle de Doenças/SES-SP

reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Castro, Paula de Sousa e

Avaliação *in vitro* da atividade de óleos essenciais sobre *Candida auris*. -2021.

Tese (Doutorado em Ciências) - Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças, São Paulo, 2021.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientação: Profa. Dra. Maria de Fátima Costa Pires.

Co-orientador(a): Dra. Patrícia de Souza Santos

1. *Candida*/crescimento & desenvolvimento. 2. Cinnamomum/efeitos dos fármacos. 3. Aldeídos/farmacologia. 4. Antifúngicos/farmacologia. 5. Produtos biológicos/ farmacologia.

SES/CCD/CD - 435/2021

Elaborada por Renan Matheus Predasoli CRB 8/9275

ESTA PESQUISA FOI REALIZADA NO LABORATÓRIO DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DO INSTITUTO ADOLFO LUTZ.

ESTE TRABALHO TEVE O APOIO FINANCEIRO DA COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR – CAPES

Dedicatória

Dedico ao meu marido Angelo, que sempre está ao meu lado me apoiando e me incentivando. Agradeço por sempre acreditar nos meus sonhos incondicionalmente.

Dedico ao meu filho Pedro Henrique, minha razão de ser, por quem sempre busquei forças para ser uma pessoa boa e melhor.

Dedico aos meus pais, Nilson e Gilda, que são e sempre foram meu alicerce, meus exemplos. Agradeço pela minha educação e por sempre me mostrarem o caminho de que apenas fazendo o bem recebemos o bem.

Dedico a minha irmã Zilda, companheira e amiga, que sempre esteve ao meu lado de maneira incondicional ao incentivar meus projetos e sempre com a mão estendida nos momentos difíceis.

Dedico à Deus, minha força vital, a quem sempre peço para que o Universo me mostre os caminhos a serem seguidos com o simples objetivo de fazer o bem.

Agradecimentos

Meu primeiro agradecimento é para minha orientadora Profa. Dra. Maria de Fátima, que com toda a sua doçura e firmeza, me fez acreditar que eu poderia trilhar um caminho novo e desafiador. Obrigada por nortear meu caminho com toda a sua competência profissional e ética.

Agradeço a minha coorientadora Patrícia, que foi minha mestre e amiga, que me acompanhou dia a dia neste caminho, sempre ensinando com muita didática e comprometimento.

Agradeço a Tirces, por toda a sua presteza em nos auxiliar em todas as nossas dúvidas e necessidades.

Agradeço a todos os professores da pós-graduação, em especial o professor Nilton. Foi um prazer e um privilégio ter sido sua aluna.

Agradeço a todos os funcionários do Instituto Adolfo Lutz e da Coordenadoria de Controle de Doenças do Estado de São Paulo.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	1
LISTA DE FIGURAS	2
LISTA DE TABELAS	3
RESUMO	4
ABSTRACT	6
1. INTRODUÇÃO	8
1.1 Gênero <i>Candida</i>	8
1.2 <i>Candida auris</i>	9
1.3 Antifúngicos sintéticos	18
Polienos	18
Azoles (Triazoles)	19
Equinocandinas (lipopeptídeos)	20
Pirimidinas Fluoradas	20
1.4 Antifúngicos naturais	21
1.5 Espécies vegetais dos óleos essenciais e seus componentes	23
<i>Cinamomum cassia</i> (L.) J.Presl	23
<i>Eucalyptus citriodora</i> Hooker	24
<i>Eucalyptus globulus</i> Labill	25
<i>Eugenia caryophyllus</i> Sprengel	26
<i>Melaleuca alternifolia</i> Chell	27
<i>Myristica fragans</i> Houtt	27
<i>Ocimum basilicum</i> Linnaeus	28
<i>Origanum majorana</i> Linnaeus	29
<i>Origanum vulgare</i> Linnaeus	30

<i>Rosmarinus officinalis</i> Linnaeus.....	30
<i>Salvia sclarea</i> Linnaeus	31
<i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	32
<i>Thymus vulgaris</i> Linnaeus	33
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe.....	33
1.6 Metabólitos secundários em plantas	34
1.7 Relevância da pesquisa	35
2. OBJETIVOS	36
2.1 Objetivo geral.....	36
2.2 Objetivos específicos	36
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	37
3.1 <i>Candida auris</i>	37
3.2 Óleos essenciais e principais compostos químicos	37
3.3 Pesquisa da atividade dos óleos essenciais e principais compostos químicos sobre <i>C. auris</i>	39
3.3.1 Preparações da suspensão de leveduras	39
3.3.2. Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre isolados de <i>C. auris</i>	39
3.3.3 Avaliação <i>in vitro</i> da atividade antifúngica dos principais compostos químicos sobre isolados de <i>C. auris</i>	40
3.4 Controles.....	40
3.5 Determinação da concentração inibitória mínima	41
3.6 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais e dos compostos químicos:	41
3.7 Ensaio da atividade antifúngica de Anfotericina B, Cetoconazol, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol.	42
3.7.1 Método E-Test® – Kit Comercial (AB-Biodisk, Solna, Suécia)	42

3.8 Controles de qualidade e biossegurança.....	43
3.9 Descartes dos resíduos	44
4. RESULTADOS.....	45
4.1 Atividade <i>in vitro</i> dos catorze óleos essenciais sobre os isolados biológicos de <i>Candida auris</i>	45
4.2 Atividade dos compostos químicos α -Humuleno a 96%, β -Cariofileno a 80%, γ -Terpineno a > 95%, Aldeído cinâmico a 99,97%, Borneol a 97,5%, Cânfora a 96%, Carvacrol a 98%, Eugenol a 99%, Isoeugenol a > 98,9%, Linalol a 97%, P-Cimeno a 99%, Terpeneol a >96%, Timol a 99,5% de pureza, sobre as cepas de <i>Candida auris</i>	46
4.3 Sensibilidade da <i>C.auris</i> aos antifúngicos sintéticos – anfotericina B, cetoconazol, flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol, utilizando as Fitas E-Test®	48
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1 Atividades de óleos essenciais	50
5.2.1 Terpenos.....	50
5.2.2 Alcaloides	51
5.2.3 Fenóis.....	52
5.2 Atividade enzimática.....	59
5.3. Atividade de antifúngicos sintéticos	60
5.4 Outras classes farmacológicas	64
6. CONCLUSÕES.....	68
REFERÊNCIAS	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C. albicans – *Candida albicans*

C. auris – *Candida auris*

C. glabrata – *Candida glabrata*

C. lusitaniae – *Candida lusitaniae*

C. cassia – *Cinnamomum cassia*

CDC – Centro de Controle de Doenças e Prevenção dos EUA

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CFM-50 - Concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.

CFM-90 - Concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

ECDC – Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças

E. citriodora – *Eucalyptus citriodora*

NYSDOH – Departamento de Saúde do Estado de Nova York

OE – Óleos essenciais

mL – mililitro

mm – milímetro

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

µg - micrograma

µL – microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Linha do tempo entre 2004 e 2018 mostrando a detecção mundial de <i>C.auris</i> .	11
Figura 2 – Distribuição de países com notificação de <i>Candida auris</i> . 2021.	12
Figura 3. Distribuição da <i>Candida auris</i> conforme clado	13
Figura 4 – Sub-tipos de <i>Candida auris</i> .	14
Figura 5 – Colônia de <i>Candida auris</i> .	16
Figura 6 – Morfologia de <i>Candida auris</i>	17
Figura 7 – <i>Cinnamomum cassia</i> – tronco.	24
Figura 8 – <i>Cinamomum cassia</i> – folhas	24
Figura 9 – <i>Eucalyptus citriadora</i> – tronco	25
Figura 10 - <i>Eucalyptus citriadora</i> – folhas	25
Figura 11 – <i>Eucalyptus globulus</i> – folhas.	26
Figura 12 – <i>Eucalyptus globulus</i> - árvore	26
Figura 13- <i>Eugenia caryophyllus</i> – planta	26
Figura 14 – <i>Melaleuca alternifolia</i> – planta	27
Figura 15 – <i>Myristica fragans</i> – árvore	28
Figura 16 – <i>Myristica fragans</i> - fruto.	28
Figura 17 – <i>Ocimum basilicum</i> – folhas	29
Figura 18 – <i>Origanum majorana</i> - planta.	29
Figura 19 – <i>Origanum vulgare</i> – planta	30
Figura 20 – <i>Rosamarinus officinalis</i> - planta.	31
Figura 21 – <i>Salvia sclarea</i> - planta.	32
Figura 22 - <i>Schinus terebinthifolius</i> – planta	32
Figura 23 – <i>Thymus vulagris</i> – planta	33
Figura 24 – <i>Zengiber officinale</i> - raízes	34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração Fungicida Mínima dos catorze óleos essenciais sobre os isolados de *Candida auris*.45

Tabela 2 - Concentração Fungicida Mínima dos compostos químicos α -Humuleno a 96%, β -Cariofileno a 80%, γ -Terpineno a > 95%, Aldeído cinâmico a 99,97%, Borneol a 97,5%, Cânfora a 96%, Carvacrol a 98%, Eugenol a 99%, Isoeugenol a > 98,9%, Linalol a 97%, P-Cimeno a 99%, Terpineol a >96%, Timol a 99,5% de pureza sobre isolados biológicos de *Candida auris*.....47

Tabela 3 – Valores da CIM para Anfotericina B, Cetoconazol, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol, utilizando as Fitas E-Test® , leitura em 48 horas.....49

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade *in vitro* dos óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus citriodora*; *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Myristica fragans*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia sclarea*, *Schinus terebinthifolius*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber officinale*, bem como dos compostos químicos desses óleos essenciais, com as menores concentrações fungicidas mínimas sobre três isolados biológicos de *Candida auris* de origem humana. Determinar e avaliar *in vitro* as concentrações fungicidas mínimas dos antifúngicos sintéticos anfotericina B, cetoconazol, flucitocina, fluconazol, itraconazol e voriconazol sobre *Candida auris*. Para avaliação da atividade antifúngica e obtenção da concentração fungicida mínima (CFM) utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo, na base 2, em meio RPMI 1640, acrescido de tensoativo Tween20, e a confirmação da inibição em Agar Sabouraud dextrose, a 37°C por 24hs. Para a avaliação da sensibilidade a anfotericina B, cetoconazol, flucitocina, fluconazol, itraconazol e voriconazol, foi utilizado o teste comercial *E-test*®. Os três isolados foram resistentes aos óleos essenciais de *Myristica fragans*, *Shinus terebinthifolius* e *Zenziber officinale*. Os outros óleos essenciais *C. cassia*, *E. citriodora*; *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M. alternifolia*, *O. basilicum*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. sclarea*, *T. vulgaris* apresentaram atividade inibitória sobre *Candida auris*. Os três isolados foram mais sensíveis ao óleo essencial de *Cinnamomum cassia*, com CFM de 0,00001 µg/mL para o isolado 1 e CFM de 0,10 µg/mL para o isolado 2 e CFM de 0,05 µg/mL para o isolado 3. *Thymus vulgaris* também apresentou menor concentração fungicida para os isolados 1 e 2, sendo encontrados os resultados de CFM de 684,76 µg/mL para o isolado 1 e CFM de 171,19 µg/mL para o isolado 2. Dos compostos químicos avaliados os três isolados biológicos foram mais sensíveis ao aldeído cinâmico, isoeugenol e timol sendo encontrados os seguintes resultados, para os isolados 1, 2 e 3 respectivamente: aldeído cinâmico – CFM 0,026µg/mL, 0,83 µg/mL e 3,33 µg/mL; isoeugenol CFM de 1,60 µg/mL, 1,60 µg/mL e 12,82

µg/mL; timol CFM de 2,93 µg/mL, 1,46 µg/mL e 11,74 µg/mL. Os três isolados foram resistentes aos compostos químicos: α-humuleno, β-cariofileno, γ-terpineno e P-cimeno. Para os antifúngicos sintéticos os três isolados foram resistentes ao fluconazol e ao voriconazol. A CIM da anfotericina B foi 0,50µg/ml para os isolados 1 e 3 e de 0,75µg/ml para o isolado 2; para o cetoconazol a CIM foi 3µg/ml para os isolados 1 e 2 e 4µg/ml para o isolado 3; a CIM da flucitocina foi de 2 µg/ml para o isolado 1, 1 µg/ml para o isolado 2 e 1,5 µg/ml para o isolado 3; para o itraconazol a CIM foi de 4 µg/ml para os três isolados. Pelo exposto e nas condições deste estudo, conclui-se os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, *Thymus vulgaris* e *Origanum vulgare*, e os compostos químicos aldeído cinâmico, isoeugenol e timol apresentaram atividade antifúngica com as menores concentrações fungicidas sobre os isolados biológicos de *Candida auris*.

Palavras-chave: *Candida*, *Cinnamomum*, aldeídos, produtos biológicos.

ABSTRACT

The objective of this search was to evaluate the *in vitro* activity of the essential oils *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus citriodora*; *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Myristica fragans*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia sclarea*, *Schinus terebinthifolius*, *Thymus vulgaris* and *Zingiber officinale* as well as the chemical compounds of these essential oils with the lowest minimum fungicidal concentrations on three biological isolates of *Candida auris* of human origin. Determine and evaluate *in vitro* the minimum fungicidal concentrations of the synthetic antifungals amphotericin B, ketoconazole, flucitocin, fluconazole, itraconazole and voriconazole on *Candida auris*. To evaluate the antifungal activity and obtain the minimum fungicidal concentration (CFM), the broth microdilution technique was used in RPMI 1640 medium, plus Tween20 surfactant, and confirmation of inhibition in Sabouraud dextrose Agar, at 37°C for 24 hours. For the evaluation of sensitivity to amphotericin B, ketoconazole, flucitocin, fluconazole, itraconazole and voriconazole, the commercial test E-test® was used. The three isolates were resistant to the oils *Myristica fragans*, *Shinus terebinthifolius* and *Zenziber officinale*. The other essential oils showed inhibitory activity on *Candida auris*. The three isolates were more sensitive to *Cinnamomum cassia* essential oil, with CFM of 0.00001 µg/mL for isolate 1 and CFM of 0.10 µg/mL for isolate 2 and CFM of 0.05 µg/mL for isolate 3. *Thymus vulgaris* also showed lower fungicidal concentration for isolates 1 and 2, with CFM results of 684.76 µg/mL for isolate 1 and CFM of 171.19 µg/mL for isolate 2. The three biological isolates evaluated were more sensitive to cinnamic aldehyde, isoeugenol and timol, with the following results being found for isolates 1, 2 and 3 respectively: Cinnamic aldehyde - CFM 0.026µg/mL, 0.83 µg/mL and 3, 33 µg/ml; Isoeugenol CFM of 1.60 µg/ml, 1.60 µg/ml and 12.82 µg/ml; timol CFM of 2.93 µg/ml, 1.46 µg/ml and 11.74 µg/ml. The three isolates were resistant to chemical compounds: α-Humulene, β-Caryophyllene, γ-Terpinene and P-Cimene. For synthetic antifungal agents,

the three isolates were resistant to fluconazole and voriconazole. The MIC of amphotericin B was 0.50 µg / ml for isolates 1 and 3 and 0.75 µg / ml for isolate 2; for ketoconazole, MIC was 3 µg / ml for isolates 1 and 2 and 4 µg / ml for isolate 3; the MIC of flucitocin was 2 µg / ml for isolate 1, 1 µg / ml for isolate 2 and 1.5 µg / ml for isolate 3; for itraconazole the MIC was 4 µg / ml for the three isolates. According to the conditions of this research, the essential oils of *Cinnamomum cassia*, *Thymus vulgaris* and *Origanum vulgare* and the chemical compounds cinnamic aldehyde, isoeugenol and thymol showed antifungal activity with the lowest concentrations of fungicides in biological isolates of *Candida auris*.

Keywords: *Candida*, *Cinnamomum*, aldehydes, biological products

1. INTRODUÇÃO

1.1 Gênero *Candida*

As doenças fúngicas apesar de ter taxa de mortalidade maior que doenças causadas por outros agentes infecciosos, são menos estudadas quando comparadas com infecções causadas por vírus e bactérias (Canela, 2017). Os principais patógenos fúngicos causadores de infecções oportunistas são *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* e *Cryptococcus neoformans*, que podem sobreviver em locais anatômicos diferentes e causar infecções severas em pacientes imunocomprometidos (Kumar et al., 2021).

As infecções fúngicas oportunistas tem como principal agente etiológico leveduras do gênero *Candida* que pode levar a infecções invasivas ou não, desde infecções de pele, de ouvido, sistema geniturinário, às infecções nosocomiais que podem ser associadas a equipamentos médicos e candidemias. As infecções causadas por *Candida* spp, estão associadas a fatores de risco como: extremos de idade, alterações hormonais, deficiência nutricional, exposição frequente a agentes antimicrobianos, tratamentos quimioterápicos entre outros. (Wijesinghe et al., 2020).

Apesar de fazer parte da microbiota humana, as espécies de *Candida* são capazes de causar infecções sistêmicas em pacientes imunocomprometidos. Nos Estados Unidos as infecções por *Candida* correspondem a aproximadamente 88% das infecções fúngicas hospitalares, podendo chegar ao número de 1,5 milhão de pacientes, podendo causar 40% de mortalidade, mesmo com os tratamentos atuais (Kim et al., 2019).

O gênero *Candida* possui espécies que apresentam patogenicidade ao homem, entre elas: *C.albicans*, *C.tropicalis*, *C.pseudotropicalis*, *C. krusei*, *C.guillermanni*, *C.stellatoidea* e *C.parapsilosis*. Causam a candidose ou candidíase que pode ser uma infecção primária ou secundária, localizada ou generalizada (Canela, 2017; Thomaz, 2018). Dentre as espécies do complexo de *Candida haemulonii* podem ser citados como patógenos oportunistas e que possuem relação com a *C. auris* e *C. pseudohaemulonii* as leveduras

emergentes *C. haemulonii sensu stricto*, *C. hanemulonii var. vulnera* e *C. duobushaemulonii* (Lima et al., 2020).

As espécies de *Candida* possuem a capacidade de se adaptar e de se proliferarem facilmente no organismo humano. Essa capacidade está relacionada a sua transição morfológica entre a forma com hifas e a levedura, sendo a forma de levedura a que é capaz de se disseminar, enquanto a forma com hifa penetra no epitélio humano com o auxílio das exoenzimas proteinases e fosfolipases (Wijesinghe et al., 2020).

O gênero *Candida* tem sido considerado como o principal patógeno causador de infecções graves em pacientes críticos, causando infecções invasivas. A candidemia invasiva está entre as causas de aumento de mortalidade, tempo de internação e custos associados ao tratamento, e a emergência de isolados multirresistentes aos antifúngicos (Canela, 2017; Thomaz, 2018).

Ao contrário de *C.albicans* as espécies de *Candida* não-albicans estão se tornando patógenos multirresistentes a drogas (Kumar et al., 2021). Garantir o tratamento adequado das espécies resistentes, tem levado a busca de novas alternativas terapêuticas, com alta variabilidade deste a pesquisa de novos antifúngicos sintéticos, como uso de substâncias naturais como os extratos e óleos essenciais de plantas e até pesquisas sobre vacinas (Moraes e Ferreira-Pereira, 2019).

1.2 *Candida auris*

Candida auris é uma levedura emergente que foi descrita pela primeira vez em 2009, isolada em uma secreção de ouvido externo de um paciente hospitalizado em Tóquio, no Japão por Satoh et al. (Hata, Humphries e Lockhart, 2020; Tsay et al., 2018).

Após o primeiro caso reportado em 2009 no Japão, em todos os continentes houve casos relatados, sempre relacionados a infecções nosocomiais e sem ausência de notificação após o primeiro caso até então em cada país (Figura 1) (Borman e Johson, 2020; Du et al., 2020).

De acordo com o Centro de Controle de Doenças dos EUA (CDC-USA) há casos únicos relatados na Áustria, Bélgica, Chile Costa Rica, Egito, Grécia, Itália, Irã, México, Noruega, Polônia, Taiwan, Tailândia e Emirados Árabes. Há relatos de identificação de vários casos na África do Sul, Arábia Saudita, Austrália, Alemanha, Bangladesh, Canadá, China, Cingapura, Colômbia, Coreia do Sul, Espanha, Estados Unidos França, Holanda, Índia, Israel, Japão, Kuwait, Malásia, Omã, Panamá, Paquistão, Quênia, Reino Unido, Rússia, Sudão, Suíça e Venezuela, com descrição em alguns países de transmissão extensa e documentada em mais de um hospital (CDC 2020; Hager et al., 2018). O CDC identificou que alguns casos nos EUA foram de pacientes que haviam tido estadias em unidades de saúde no Egito, Índia, Quênia, Kuwait, Paquistão, África do Sul, Coreia do Sul, Emirados Árabes Unidos e Venezuela.

Pasqualotto, Sukiennik e Meis (2019) em uma investigação na América Latina, com descrição de casos no Brasil, avaliaram que poucos centros no país possuíam o teste MALDI-Tof, bem como a capacidade de realizar o sequenciamento do DNA fúngico e por isso questionam se realmente não havia à época a presença da *C.auris* no Brasil.

Em 2017 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) já havia divulgado um documento alertando sobre o surgimento de *C. auris*, recomendando a notificação e envio de cepas para laboratórios regionais de referência. Em dezembro de 2020 foram identificados os primeiros casos no Brasil, em pacientes de um hospital terciário do município de Salvador no Estado da Bahia (Figura 2) (Almeida Jr. et al., 2021).

O primeiro paciente identificado com *C.auris* estava internado para tratamento de COVID-19, ficando mais de 30 dias na Unidade de Terapia Intensiva (UTI). Foram investigados os outros pacientes que ficaram na mesma UTI, além de contatos próximos e da equipe de saúde. Ainda foram coletadas amostras de materiais e equipamentos, além da área física próximo ao paciente (Almeida Jr. et al., 2021a).

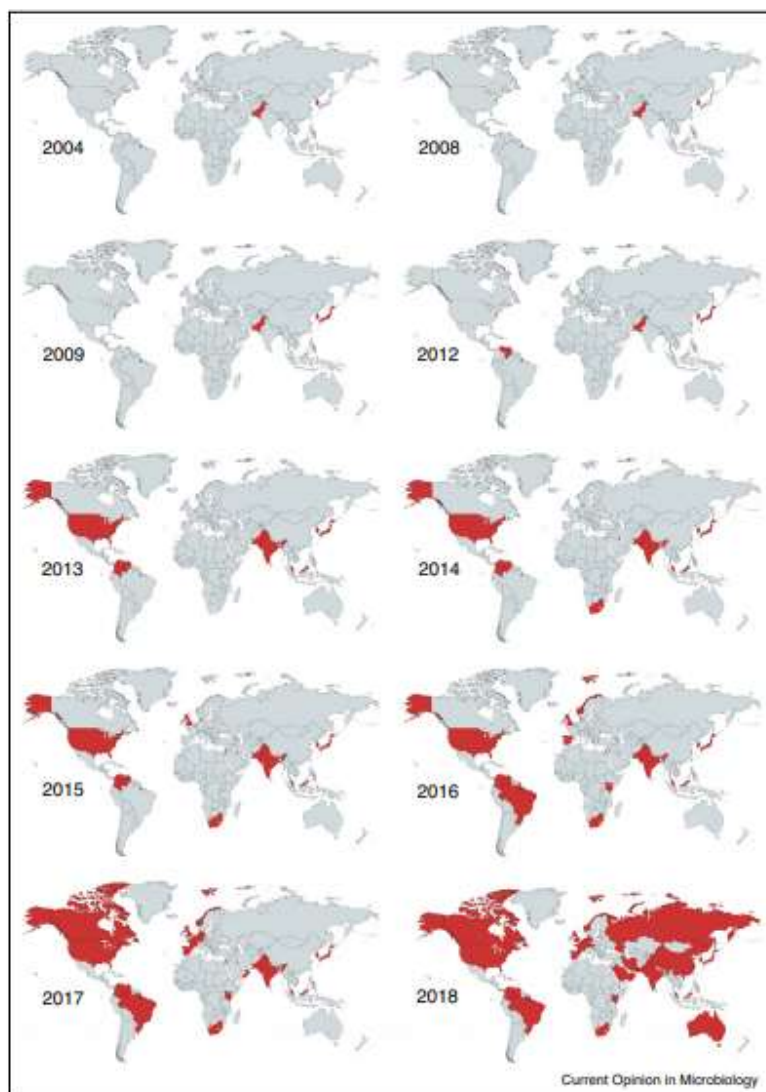


Figura 1. Linha do tempo entre 2004 e 2018 mostrando a detecção mundial de *C.auris*.
 Fonte: (Rodhes e Fischer, 2019).



Figura 2 – Distribuição de países com notificação de *Candida auris*. 2021

Fonte: CDC, 2021. https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/maps/world-candida-auris-map.jpg?_=87881

No entanto, Du et al. (2020), relatam que houve um primeiro isolado de *C. auris* em 1996, que foi identificado incorretamente como *Candida haemulonii* na Coreia do Sul, além de descreverem como raras as infecções por esse patógeno antes de 2009, sugerindo uma evolução do fungo. Além do diagnóstico errôneo como *C. haemulonii*, pode ainda haver diagnóstico equivocado como *Candida famata* (Hata, Humphries e Lockhart, 2020; Hager et al., 2018).

Outro estudo na Coreia do Sul, onde haviam identificado 15 isolados de *C. haemulonii* em pacientes com otite crônica, posteriormente foram identificadas como *C.auris* (Rodhes e Fischer, 2019). *C.auris* pode ser identificada como um novo membro do complexo *C. haemulonii*, que após sequenciamento genético mostrou similaridade (Hata, Humphries e Lockhart, 2020).

Para a avaliação da relação de *C. auris* com outras espécies de *Candida*, foram realizados estudos que identificaram nas comparações preliminares do genoma e revelaram que sequências de *C. auris* não se

alinham com *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. lusitaniae* e *Saccharomyces cerevisiae* (Spivak e Hanson, 2018).

Estudos sobre o sequenciamento do genoma identificou pelo menos quatro linhagens clonais filogeneticamente (Figura 3) de acordo com as associações das regiões geográficas distintas: clado I (sul da Ásia), clado II (Leste Asiático), clado III (África do Sul) e clado IV (África do Sul) (Borman e Johson, 2020; Spivak e Hanson, 2018). Após a análise filogeográfica foi possível identificar a introdução de diversos clados nos Estados Unidos (clados I e IV), Reino Unido (clados I e III), Quênia (clados I e III), Israel (clados III e IV), Alemanha (clados I e III), Espanha e Austrália (clado III), França, Arábia Saudita e Emirados Árabes (clado I) (Chakrabarti e Sood, 2021).

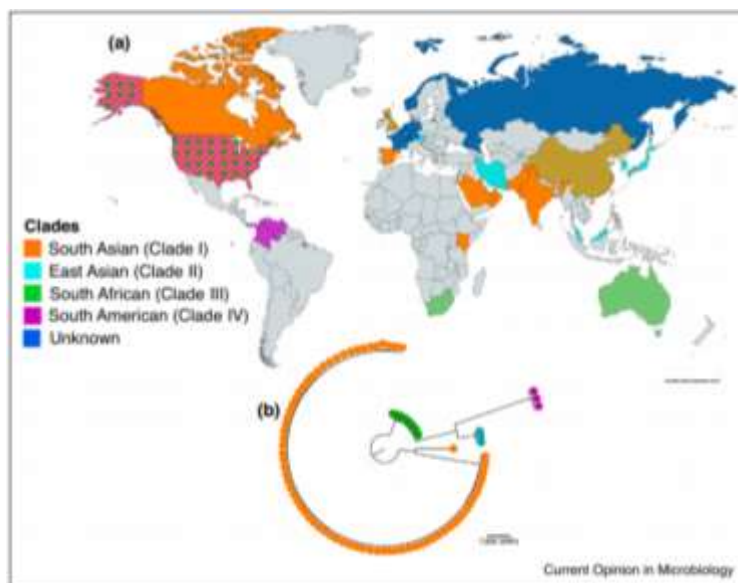


Figura 3. Distribuição da *Candida auris* conforme clado

Fonte: (Rodhes e Fischer, 2019).

a) Distribuição global de clados de *Candida auris* (em 28 de fevereiro de 2019) e b) Filogenia RAxML mostrando a relação entre *C.auris* clados.

A figura 4 apresenta os subtipos de *C. auris* conforme localização dos primeiros isolados (Du et al., 2020).

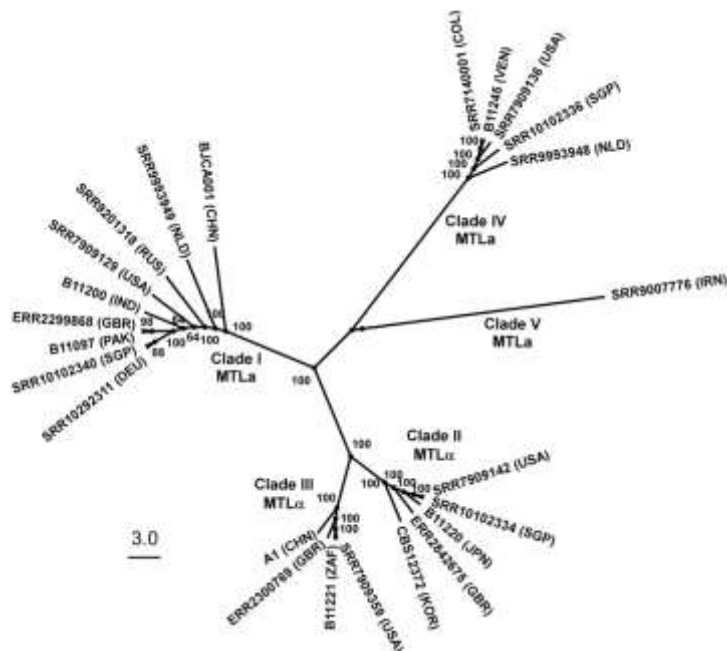


Figura 4 – Sub-tipos de *Candida auris*.

Fonte: Du et al., 2020

Shabam, Patel e Ahmad (2020) relatam que estudos identificaram diferenças entre os clados geográficos relacionados à capacidade de produção de proteinases, fosfolipases e atividade da hemolisina.

Rodhes e Fischer (2019) relatam que a avaliação genômica mostrou que há divergência dentro da espécie de *C. auris*, com variação entre os clados geográfico. O clado do Leste Asiático apresenta possibilidade de infecção apenas de ouvido, enquanto os outros clados apresentam surtos com infecções invasivas e de transmissão hospitalar. Há ainda uma associação de mutação de resistência em genes específicos (ERG11) para drogas antifúngicas azólicas nas regiões da África do Sul, América do Sul e Sul Asiático. Ainda relatam que isolados clonais do Sul Asiático foram identificados em hospitais localizados a milhares de quilômetros de distância na Índia, confirmando a natureza nacional da transmissão e potencial para mutações de resistência a antifúngicos se espalharem, e que isolados de hospitais localizadas a aproximadamente 700 km de distância na Colômbia foram considerados geneticamente idênticos.

Entre os anos de 2013 e 2019, *C. auris* causou surtos localizados em áreas metropolitanas de Nova York, levando a 23 óbitos dos 51 primeiros casos clínicos. O Departamento de Saúde do Estado de Nova York (NYSDOH) desenvolveu então um teste e protocolos para a vigilância dos casos. O estudo de O'Brien, Chatuverdi e Chatuverdi (2020) relata que mais de 20.000 amostras foram estudadas de 194 instituições. Os estudos de investigação dos primeiros isolados de Nova Iorque descobriram semelhanças com os isolados do sul da Ásia, no entanto distintos de Nova Jersey (Spivak e Hanson, 2018).

No Reino Unido em abril de 2015, um caso inicial foi relatado no *Royal Brompton Hospital*. Em uma semana foi identificada em outra paciente. Após aproximadamente sete meses, nove casos já haviam sido identificados como candidemia. Após introdução de medidas de controle e identificação de fonte de infecção, pacientes colonizados foram identificados. Essa análise temporal apresenta que possivelmente a introdução da *C. auris* ocorreu um mês antes do caso índice (Rodhes e Fisher, 2019).

A partir de 2016 alertas foram sendo divulgados pelo CDC-USA, pelo Centro Europeu para Prevenção e Controle de Doenças (ECDC) e pelo *Public Health England*, para médicos, profissionais de laboratório e profissionais de saúde pública sobre a importância da ameaça emergente representada por *C. auris* (Spivak e Hanson, 2018).

Em 2017 com o comunicado de risco da ANVISA, houve a definição de uma Rede Nacional para identificação de casos de *C.auris* em serviços de saúde no Brasil, analisando as amostras suspeitas. Em dezembro de 2020, com análise fenotípica e sequenciamento genético do microrganismo foi então confirmado laboratorialmente o primeiro caso no Brasil (ANVISA, 2020).

C. auris além da capacidade de colonizar pacientes, pode ainda até mesmo estar presente em pacientes já em tratamento com antifúngicos, (Borman e Johnson, 2020; Osei Sekyere, 2018). Há estudos que apresentam 59% de taxa de mortalidade de pacientes com infecção com *C. auris* (Hager et al., 2018), mas pode apresentar taxas de mortalidade de até 78%, em

especial em pacientes com doença crônica ou imunodeprimidos (Shaban, Pahel e Ahmad, 2020, Wickes, 2020).

As manifestações clínicas podem ocorrer em qualquer local do organismo, sendo geralmente uma infecção nosocomial. *C. auris* já foi isolada na urina, bile, sangue, feridas, narinas e secreções respiratórias, mucosas, pele e reto (Spivak e Hanson, 2018). Em relação a presença do fungo no trato gastrointestinal, os estudos e manifestações clínicas dos infectados sugerem que o fungo seja incapaz de colonizar tecidos anaeróbicos, sendo mais comumente associada a infecções de corrente sanguínea (Du et al., 2020).

A patogenicidade de *Candida spp* é atribuída a capacidade de aderência, morfogênese, produção de biofilmes e enzimas hidrolíticas, mas essas informações ainda são limitadas para *C. auris*, mas que são essenciais para o desenvolvimento de drogas antifúngicas (Shaban, Pahel e Ahmad, 2020; Spivak e Hanson, 2018). A investigação do genoma de *C. auris* mostrou que esta levedura possui mais de 5.000 genes codificadores de proteínas, que expressam vários fatores de virulência, faz formação de biofilme e aderência, porém em menor grau que *C. albicans* (Rodhes e Fischer, 2019).

De acordo com Hata, Humphries e Lockhart (2020) as características macroscópicas de *C. auris* podem ajudar na identificação. Quando em ágar Sabouraud dextrose observa-se colônias butíricas lisas de cor branca a creme (Figura 5).



Figura 5 – Colônia de *Candida auris*
Fonte: Hata, Humphries e Lockhart (2020)

Microscopicamente, possui células únicas, de aparência ovóide e alongada (Figura 6).



Figura 6 – Morfologia de *Candida auris*

Fonte: <https://tm.ibxk.com.br/2020/12/09/09133525134159.jpg?ims=1120x420>

Assim como outras espécies de *Candida*, esse patógeno é considerado oportunista, sendo associada à sua presença a pacientes imunocomprometidos e em estado grave, com principais fatores de risco: idade avançada, diabetes mellitus, procedimentos cirúrgicos e invasivos (como cateter venoso central), doença renal crônica e pacientes em uso de antibióticos e antifúngicos (Du et al., 2020).

Com o conhecimento da resistência da *C. auris* às drogas antifúngicas, a busca por alternativas de tratamento para o controle desse patógeno se mostra indispensável para o cuidado médico (Shaban, Pahel e Ahmad, 2020). Mas não só o conhecimento pelo melhor tratamento se faz necessário, mas também a necessidade de entendimento epidemiológico e conhecimento de biologia básica e molecular deste fungo. A identificação deste fungo trouxe a necessidade de novos estudos sobre desenvolvimento de antifúngicos (Wickes, 2020).

C. auris pode contaminar ambientes e equipamentos, podem estar presentes no ar, em superfícies úmidas e secas e pode durar por semanas (Hata, Humphries e Lockhart 2020). Os estudos para padronizar a desinfecção de ambientes ainda são escassos (Wickes, 2020). Características como tolerância a temperatura e osmolaridade podem

contribuir para a persistência e sobrevivência da *C.auris* em superfícies biológicas e inanimadas por longos períodos, sendo tolerante a exposição de desinfetantes comuns (Du et al., 2020). De acordo com Chakarbarti e Sood (2021), *C. auris* resiste a compostos de amônio quaternário, ácido peracético, ciclos de ultravioletas e concentrações padrão de hipoclorito de sódio.

Para o controle adequado da disseminação de *C. auris* serão necessárias ações multidisciplinares para o controle e a prevenção, com adequada estratégia para diagnóstico, isolamento e rastreamento dos casos, além de cuidados individuais e protocolos de limpeza e desinfecção dos ambientes (Chakrabarti e Sood, 2021).

1.3 Antifúngicos sintéticos

Os antifúngicos são todas as substâncias capazes de produzir alteração nas estruturas de uma célula fúngica, inibindo a capacidade de desenvolvimento e sobrevivência, de maneira direta ou indireta. Os antifúngicos são classificados por critérios convencionais de acordo com a origem das substâncias, podendo ser dividida de acordo com a estrutura da composição como: polienos, azoles, alilaminas, lipopeptídeos e pirimidinas fluoradas (Gregori Valdez, 2005).

Além da classificação por estrutura, os antifúngicos são classificados por local de ação, sendo os lipopeptídeos de ação na parede celular; os polienos, azóis e alilaminas na membrana celular e as pirimidinas fluoradas interagem no núcleo (Geralddez Valdes, 2005).

O tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida* é geralmente realizado com a utilização de classes de antifúngicas: poliênicos, azólicos e equinocandinas (Canela, 2017).

Polienos

Os polienos são fármacos que se ligam ao ergosterol presente na membrana celular do fungo, levando a perda de proteínas carboidratos e

cátions monovalentes e divalentes, causando a morte celular (Canela, 2017; Gregori Valdes, 2005).

São exemplos de polienos: a nistatina, a natamicina e anfotericina B. A Anfotericina B é normalmente ativa contra a maioria das espécies de *Candida*, no entanto tem como grande desvantagem ser hepato e nefrotóxica (Canela, 2017).

A Anfotericina B pertence a classe de polieno disponível clinicamente e possui três congêneres de lipídios: anfotericina B lipossomal, complexo lipídico de anfotericina B e dispersão coloidal de anfotericina B. No entanto, as formulações lipídicas de anfotericina B são em geral menos potentes. Há também diferenças na farmacocinética e farmacodinâmica desses componentes que podem determinar a penetração em certos tecidos como do sistema nervoso central (Lepak e Andes, 2015).

As formulações de anfotericina lipossomal (L-AmB) e de anfotericina em complexo lipídico (ABLC) apresentam menor frequência de toxicidade renal quando comparada a anfotericina B deoxicolato (d-AmB). Análises de farmacoeconomia já foram desenvolvidas tendo em vista o alto custo das formulações lipídicas, mas que podem ser uma opção viável ao se comparar com todos os custos de uma hospitalização prolongada que necessidade de exames e procedimentos adicionais (Falci e Pasqualotto, 2015).

Azoles (Triazoles)

Os azoles são substâncias que inibem o citocromo P-450-3-A da célula fúngica, interrompendo a síntese de ergosterol na membrana celular que por sua falta faz com que haja acúmulo de esteróis tóxicos intermediária, aumentando a permeabilidade da membrana celular e interrompendo assim o crescimento fúngico (Kim et al., 2019; Canela, 2017; Gregori Valdes, 2005).

Os azoles ou azóis podem ser divididos de acordo com a sua estrutura, os com duas moléculas de nitrogênio – os imidazóis (miconazol e clotrimazol), e os com três moléculas de nitrogênio – os triazóis (fluconazol, itraconazol e cotoconazol), que por terem um acréscimo de nitrogênio apresentam maior

seletividade pelo sítio de ação em relação aos imidázóis, que aumenta a sua estabilidade metabólica, prolongando sua meia vida plasmática. Há ainda os triazóis de segunda geração: voriconazol, ravuconazol e posaconazol (Rossi, 2009).

As drogas azólicas como o fluconazol, voriconazol, itraconazol e posaconazol tem estudos mais extensos sobre a ação em espécies de *Candida*, com avaliação inclusive de contexto profilático (Lepak e Andes, 2015).

Equinocandinas (lipopeptídeos)

Os lipopeptídeos são antifúngicos que agem inibindo a síntese das glucanas por meio da inativação da enzima 1,3-beta-glucana sintetase, fazendo com que a falta de glucanos na parede celular torne o fungo incapaz de suportar o estresse osmótico e assim morrer (Gregori Valdes, 2005).

A classe de antifúngicos lipopeptídeos mais recentemente desenvolvida é a das equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina), descobertos em 1974 (Gregori Valdes 2005), identificado atividade contra as espécies mais comuns de *Candida*, com menor potência *in vitro* para a *C. parapsilosis* (Canela, 2017).

A atividade fungicida das equinocandinas contra a maioria das espécies de *Candida* é dependente da concentração (Pristov e Ghannoum, 2019).

Pirimidinas Fluoradas

As pirimidinas fluoradas são antimetabólicos, sendo transportadas pela citosina permeasse para o citoplasma da célula fúngica e então convertida em 5-fluouracil (5-FU) pela citosina diaminase. O 5-FU é fosforilado e incorporado ao RNA inibindo a síntese de proteínas na célula, além de também inibir a síntese de proteínas fúngicas (Gregori Valdes, 2005).

Estudos identificaram a ação da flucitocina sob o efeito em infecções causadas por *Candida*, sendo já avaliado que a administração de doses menores, mas em maior frequência pode ser uma estratégia ideal de uso, uma vez que a eficácia pode ser aumentada e a toxicidade limitada (Lepak e Andes, 2015).

1.4 Antifúngicos naturais

Há informações que o uso das plantas medicinais acontece desde a pré-história, com registros de que o homem ao se alimentar de raízes e ervas, de maneira instintiva utilizava as plantas como medicamentos. Outros registros arqueológicos já provaram que povos, em especial os orientais, conheciam o poder das plantas, utilizando-as como remédios, substâncias aromáticas e extraindo os óleos essenciais (Costa, 2014. p.12).

O uso de plantas nativas das Américas é registrado por pesquisas arqueológicas há mais de dez mil anos, como por exemplo o uso do abacate, da batata-doce, do mate, do cacau e do milho. A incorporação do uso de plantas medicinais na Europa por portugueses e espanhóis acompanharam os ciclos de colonização. A utilização por exemplo, de raízes de salsaparrilha (espécie de *Smilax*) e do guaiaco (*Guaiacum officinale* L.) para o tratamento de sífilis. (Simões et al., 2017, p.29).

O uso das plantas para tratamento medicinal além do uso pela cultura popular, já fez com que órgãos governamentais buscassem por implantar diretrizes para o uso racional, seguro e eficaz de plantas com uso medicinal. Estudos multidisciplinares sobre as atividades farmacológicas e toxicológicas das plantas, com atenção especial para identificação dos exatos e agentes farmacológicos (Paula, 2010). Atualmente o uso de plantas medicinais vem ganhando destaque com a utilização preventiva e curativa, porém com o cuidado de que as plantas merecem cuidados na sua utilização uma vez que é preciso conhecimento de seus componentes (Costa, 2014 p.12).

A resistência aos antibióticos tem sido uma preocupação dos estudos médicos, pela busca do uso adequado destes fármacos. Assim, a descoberta de novas drogas tem sido essencial para o adequado tratamento das doenças. Por isso, a atividade biológica dos óleos essenciais tem sido alvo de pesquisa para avaliação de potencial terapêutico e farmacológico, com a busca pela caracterização dos componentes químicos e suas propriedades. (Pedrosa, 2012; Contieri, 2017).

O óleo essencial é um princípio ativo ou um grupo de princípios ativos natural proveniente de plantas, e que possui atividades importantes para o metabolismo, proteção e conservação do vegetal em que ele se encontra. Acredita-se que possa existir mais de trinta mil espécies vegetais produtoras de óleos essenciais. Os óleos essenciais recebem sempre o nome do vegetal do qual ele é extraído, sendo que é importante destacar que apenas substâncias naturais podem ser chamadas de óleos essenciais. Quando há produção artificial, chamamos de essência e não mais de óleo. São insolúveis em água, e solúveis em álcool (Amaral, 2015. p. 1; Contieri, 2017).

Os óleos essenciais, também denominados óleos etéreos ou óleos voláteis são obtidos por partes de plantas por meio da destilação por arraste a vapor de água, ou por espremedura do pericarpo de frutos cítricos (Oliveira, 2018).

O conhecimento da ação farmacológica das plantas medicinais apresenta que suas propriedades terapêuticas podem não ser estáveis e não se distribuem de maneira homogênea em toda a sua apresentação natural. Os compostos químicos podem apresentar diferente concentração nas diferentes partes das plantas, como: folhas, caules, raízes, sementes, flores e frutos (Costa, 2014 p.13; Contieri, 2017).

Em vários óleos essenciais já foram identificadas atividade antifúngicas contra fungos patogênicos, incluindo as leveduras, podendo contribuir para o desenvolvimento de medicamentos inovadores (Tran, Graham e Adukwu, 2020).

1.5 Espécies vegetais dos óleos essenciais e seus componentes

Os óleos essenciais são compostos naturais complexos, provenientes de plantas, podendo ser extraído de qualquer de suas partes, tendo como principal característica ser volátil. A composição química é complexa e pode apresentar de dezenas a centenas de compostos em única mistura, sendo constituído por outros metabólitos secundários, terpenos, terpenóides e compostos fenólicos (Oliveira, 2018). Ainda possui a característica de interagir com os lipídeos da membrana celular bacteriana e mitocondrial (Solórzano-Santos *apud* Pedrosa, 2012). Essa capacidade antimicrobiana pode ser atribuída aos terpenóides e aos compostos fenólicos como o timol e o carvacrol, entre outras substâncias (Duarte, 2006).

Os extratos e óleos essenciais tem sua eficácia estudada no controle de crescimento de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, além de ação antitumoral, anti-inflamatória e analgésica (Lima et al., 2014; Scherer et al., 2009).

***Cinamomum cassia* (L.) J.Presl**

A *Cinnamomum cassia* é uma espécie arbórea aromática (Figuras 7 e 8), de onde se retiram de seus ramos jovens a canela, que é muito utilizada pela fragrância e sabor picante. A *C. cassia* tem sido estudada devido as potencialidades farmacológicas e fitoquímicas, para o tratamento de doenças cardiovasculares, gastrointestinais, distúrbios ginecológicos e doenças inflamatórias, efeitos antitumoral, analgésico, antidiabético e antiobesidade, antibacteriano e antiviral. A composição fitoquímica da *C. cassia* já identificou mais de 160 componentes. Os mais abundantes são os terpenóides, e os fenilpropanoides. São componentes bioativos, sendo o cinamaldeído considerado o componente mais representativo desta planta. Zhang et al. em 2019 apresentam que dentre os componentes químicos da *C. cassia* 64 são terpenóides, 16 são fenilpropanoides, 12 são glicosídeos, 26 lignanas, 9

lactonas e 27 outros componentes. Esses componentes são encontrados na casca, folhas e galhos (Zhang et al., 2019).

Os compostos extraídos de várias partes da canela, seja da casca, folhas, frutos ou flores, já são utilizados no tratamento medicinal. Na medicina popular na Ásia, a canela é utilizada no tratamento de doenças inflamatórias, vaginites, reumatismo e neuralgias, doenças respiratórias, digestivas e urinárias (Wijesinghe et al., 2020).

As principais atividades descritas da *C. cassia* são: estimulante aromático, tônico digestivo, antisséptico, espasmódico, anticoagulante, bactericida e bacteriostático (Costa, 2014. p.94).

Os principais compostos do óleo essencial da *C. cassia* são os terpenóides, sendo divididos em monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos, sendo o principal componente o aldeído cinâmico.



Figura 7 – *Cinnamomum cassia* – tronco
https://cdn.shopify.com/s/files/1/2177/8187/products/cinnamon_tree.jpg?v=1544018177

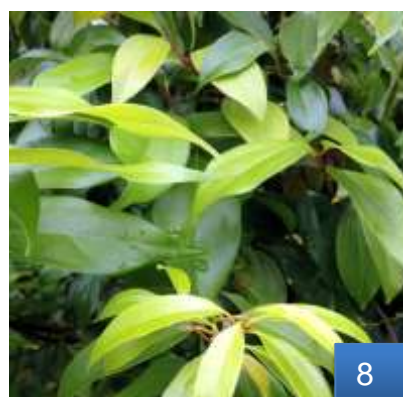


Figura 8 – *Cinnamomum cassia* – folhas
https://cdn.shopify.com/s/files/1/0089/3075/4665/products/cassia_Cinnamomum_cassia_1024x.jpg?v=1551981434

***Eucalyptus citriodora* Hooker**

O *Eucalyptus citriodora* pertence à família *Myrtaceae* que compreende mais de 900 espécies e é nativo da Austrália (Figuras 9 e 10). Tem sido cultivado devido a madeira, polpa e óleos essenciais por apresentarem propriedades medicinais. Extratos de água quente de folhas

secas de *E. citriodora* são usadas nos efeitos analgésicos, anti-inflamatórios e antipiréticos (Sebei, 2015).

Os óleos essenciais são destilados das folhas e possuem registros de atividade anti-inflamatória, imunorreguladora, antioxidante e analgésico e aumentarem a capacidade fagocítica de monócitos e macrófagos (Ho, Li, Weng et al., 2020).

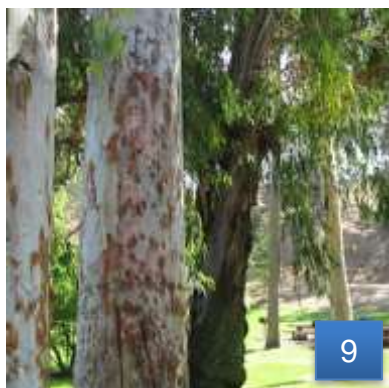


Figura 9 – *Eucalyptus citriodora* – tronco
https://www.hobbyseeds.com/image/cache/data/products/lemon-scented-gum-eucalyptus-citriodora_2-600x600.jpg

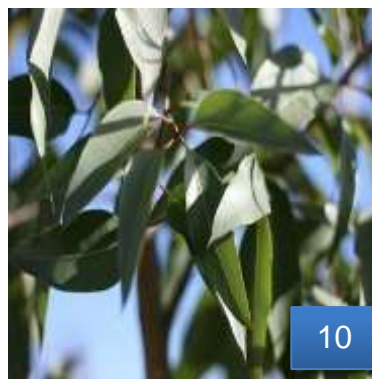


Figura 10 - *Eucalyptus citriodora* – folhas
https://www.alsagarden.com/180-large_default/eucalyptus-citriodora-seeds.jpg

***Eucalyptus globulus* Labill**

No Brasil a espécie *Eucalyptus globulus* é conhecida como eucalipto, eucalipto-limão e eucalipto-comum (Figuras 10 e 11). É uma espécie nativa da Austrália e da Tasmânia, que foi introduzida na China e depois distribuída para África do Sul, Índia, Sul da Europa e Brasil. As folhas, flores e frutos, bem como a casca do caule da planta tem interesse farmacológico. Os óleos essenciais podem ser obtidos das folhas ou da casca, por meio de hidro destilação, por arraste de vapor e por maceração (Brasil, 2018).



Figura 11 – *Eucalyptus globulus* – folhas
https://cdn.shopify.com/s/files/1/0269/438/1/5757/products/Eucalyptus_Leaves_ac3dc234-6502-4e82-8024-7596f4276fe0_720x.jpg?v=1578070433

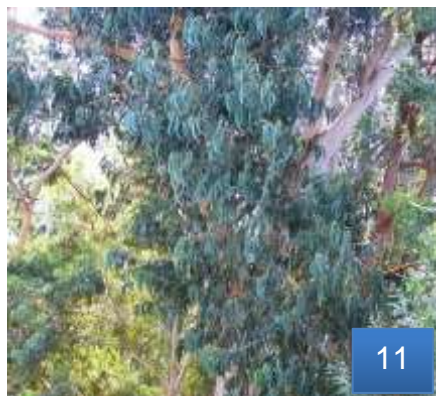


Figura 12 – *Eucalyptus globulus* - árvore
https://www.alsagarden.com/947-large_default/eucalyptus-globulus-gommier-bleu-graines.jpg

***Eugenia caryophyllus* Sprengel**

A *Eugenia caryophyllus* (Figura 13) é uma planta arbórea, que possui sabor ardente e forte odor aromático, sendo nativa da Indonésia. A composição química é constituída por eugenol, acetato de eugenol, betacariofleno e ácido oleânico além de triterpeno, ceras vegetais, cetonas, resinas, taninos e esteróis. O eugenol é conhecido já por suas atividades anti-inflamatórias, cicatrizantes, analgésicas, e atividade no sistema gastrointestinal (Silvestri et al., 2010).



Figura 13- *Eugenia caryophyllus* – planta
https://scontent.fgru5-1.fna.fbcdn.net/v/t1.0-9/39742522_2026463667399011_900661127371816960_n.jpg?

***Melaleuca alternifolia* Chell**

A *Melaleuca alternifolia* é uma espécie da família *Myrtaceae* (Figura 14), nativa da Austrália e Ilhas do Oceano Índico, e é conhecida como árvore do chá (Pegard, 2015). O ingrediente ativo extraído das folhas é obtido por arraste a vapor (ANVISA, 2016). O óleo extraído das folhas tem constituição química bem conhecida, sendo o terpinen-4-ol responsável pelas propriedades medicinais, como atividades antifúngicas e antibacterianas (Vieira et al., 2004).

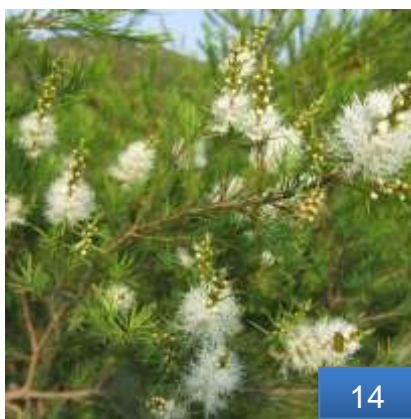


Figura 14 – *Melaleuca alternifolia* – planta

https://www.filhadaterra.com/media/catalog/product/cache/1/img_caracteristicas/040ec09b1e35df139433887a97daa66f/t/e/tea-tree-2.jpg

***Myristica fragans* Houtt**

A *Myristica fragans*, conhecida como noz-moscada (Figuras 15 e 16) é uma planta que foi introduzida no ocidente ao final da Idade Média. A semente sempre foi empregada como tempero, sendo utilizada até os dias atuais. Já os óleos essenciais são produtos farmacêuticos utilizados hoje para formulação de medicamentos para tratamento de infecções respiratórias, digestivas e como aromatizante cosmético (Teixeira et al., 2008).



Figura 15 – *Myristica fragans* – árvore
https://antropocene.it/wp-content/uploads/2018/11/Myristica_fragrans-800x445.jpg



Figura 16 – *Myristica fragans* - fruto
https://assetscdn1.paytm.com/images/catalog/product/H/HO/HOMSPICE-TREE-SSHOP1144315E823BF6/1566766602597_0..jpg?imwidth=320&impolicy=hq

***Ocimum basilicum* Linnaeus**

O *Ocimum basilicum*, conhecido como manjeriço (Figura 17) pertence à família Lamiaceae, possui diferentes espécies que podem ser classificadas pelo aroma e por características morfológicas. O mais conhecido é o de cor verde e os de folhas avermelhadas são raros e aromáticos. O uso *in natura*, do óleo essencial é um importante produto na indústria cosmética e de aromatização, apresenta propriedades inseticidas e repelentes. Na cultura popular, as folhas e flores são usadas para infusões devido as propriedades digestivas e tônicas. A extração do óleo é realizada geralmente por processo de destilação (Luz et al., 2014).

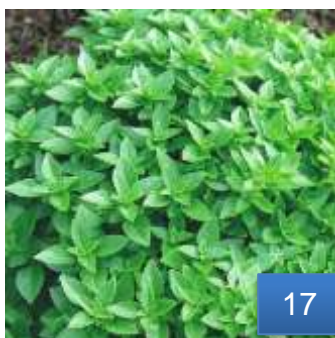


Figura 17 – *Ocimum basilicum* – folhas
https://www.alsagarden.com/2691-large_default/greek-basil-ocimum-basilicum-seeds.jpg

***Origanum majorana* Linnaeus**

A *Origanum majorana* conhecida por manjerona, é uma espécie da família Lamiaceae, originária da Europa Meridional e se desenvolve em locais com clima subtropical e temperado (Figura 18). As folhas são simples e possui flores esbranquiçadas, róseas ou violáceas. Os óleos essenciais produzidos são utilizados para tratamentos diversos, como asma, cefaleia, distúrbios reumatológicos, distúrbios neurológicos, com descrição de atividade para epilepsia e para sedação. Na composição são encontrados terpenos, fenólicos e flavonoides, com descrição de atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante (Sales et al., 2020).



Figura 18 – *Origanun majorana* - planta
https://cdn.shopify.com/s/files/1/0108/5782/products/23266_D828-1220102gk_720x.jpeg?v=1550504792

***Origanum vulgare* Linnaeus**

O gênero *Origanum* é subdividido em 43 espécies e 18 híbridos. As espécies são herbáceas encontradas em diferentes partes do mundo. Os componentes encontrados nas espécies de *Origanum* depende diretamente da técnica de extração, mas na maioria contém fenóis, terpenos e derivados, linalol, limoneno, timol e carvacrol. Estudos já descreveram atividades antifúngicas e antimicrobianas das espécies *O. heracleoticum*, *O. majorana*, *O. onites*, *O. vulgare* (Figura 19) e *O. syriacum* (Hou, 2020).



Figura 19 – *Origanum vulgare* – planta
https://www.anniesannuals.com/signs/o/images//origanum_compact_nana_01.jpg

***Rosmarinus officinalis* Linnaeus**

O *Rosmarinus officinalis* conhecido popularmente como alecrim (Figura 20), é uma planta da família Lamiaceae, de origem da Tunísia, Marrocos e Brasil. A extração do óleo acontece da planta inteira (Amaral, 2015. p.97).

É utilizado como condimento em alimentos e com indicações farmacêuticas já estudadas. O óleo tem entre os compostos hidrocarbonetos

monoterpenos, ésteres terpênicos, linalol, verbinol entre outros (Ribeiro et al., 2012).

Atribui-se ao óleo de *R. officinalis* atividade tônica, estimulante, antisséptica, cicatrizante e antimicrobiana e inibição de crescimento de salmonelas, *Escherichia coli* e estafilococos (Costa, 2014, p. 36).



Figura 20 – *Rosmarinus officinalis* - planta

<https://cdn.awsli.com.br/600x450/122/122162/produto/59632359/32cb768ef4.jpg>

***Salvia sclarea* Linnaeus**

A *Salvia sclarea* é uma planta da família *Lamiaceae*, possui atividade tônica, digestiva, diurética, emoliente, hipoglicemia, estimulantes, adstringente, antisséptica, aromática e antioxidante entre outras atividades (Figura 21) (Costa, 2014. p.225).

Podemos encontrar como constituintes terpenos, ácido ursólico, cincol, ácido oleanico, ácidos orgânicos, glicosídeos, alfa e beta-amirina (Costa, 2014. p.225).



Figura 21 – *Salvia sclarea* - planta

https://www.alsagarden.com/211-large_default/salvia-sclarea-seeds.jpg

***Schinus terebinthifolius* Raddi**

A *Schinus terebinthifolius*, conhecida popularmente como pimenta-rosa (Figura 22) é cultivada a partir de sementes. Possui atividades anti-hemorrágicas, anti-inflamatórias, cicatrizantes, hemostática e adstringente e aplicação em ferimentos infeccionados ou não (Costas, 2014 p.63).



Figura 22 - *Schinus terebinthifolius* – planta

https://scontent.fgru5-1.fna.fbcdn.net/v/t1.0-9/22852059_1670301519681896_208653977611139825_n.jpg?nc_cat=105&nc_sid=730e14&nc_eui2=AeEB3B3jnV399p_uVYrGbPTx0DH7ZE3EXjDQMftkTcReMDSQv02oVliHP2s3e6jnFWtGQP2isH_urV7QV1ppEETo&nc_ohc=VLYNv7jq9PEAX8y0rUa&nc_ht=scontent.fgru5-1.fna&oh=a52af4fca25adb8f3055f3eb747af2e8&oe=5F79D602

***Thymus vulgaris* Linnaeus**

Thymus vulgaris, conhecido como tomilho (Figura 23), é uma planta da família Lamiaceae, originário do Mediterrâneo, Espanha, França, Tunísia, Índia e Brasil. O óleo é extraído dos ramos. O óleo de *T. vulgaris*, é amplamente utilizado na França. (Amaral, 2015. p.124).

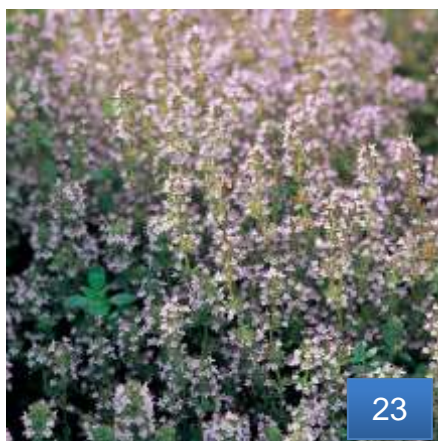


Figura 23 – *Thymus vulagris* – planta

<https://img.crocdn.co.uk/images/products2/pl/20/00/01/88/pl2000018851.jpg?width=940&height=940>

***Zingiber officinale* Roscoe**

O *Zingiber officinale*, conhecido popularmente como gengibre (Figura 24), possui entre as atividades descritas ser: estimulante, carminativo, digestivo, diurético, antidepressivo, antitrombótico, antiasmático e antisséptico entre outras atividades(Costa, 2014. p.156).



Figura 24 – *Zingiber officinale* - raízes

https://ecs7.tokopedia.net/img/cache/700/product-1/2016/10/24/9615945/9615945_146ce7c1-996a-4ac0-96f8-f68c26e8a9cc.jpg

1.6 Metabólitos secundários em plantas

Os produtos químicos produzidos por vegetais podem ser divididos em dois grupos: metabólitos primários ou macromoléculas e metabólitos secundários ou micromoléculas. No grupo dos metabólitos primários estão incluídos os lipídeos, protídeos e glicídios que possuem funções vitais bem definidas. O segundo grupo, os metabólitos secundários são derivados de rotas biossintéticas do metabolismo primário (Simões et al., 2017, p. 23).

Os metabólitos secundários em plantas são substâncias necessárias para o desenvolvimento das funções vitais da planta. Podem ser divididos em grupos de acordo com a biossíntese: terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos (Santos, 2016).

Esses metabólitos secundários atuam na defesa do vegetal mas podem agir também como toxinas. Podem ser citados como metabólitos secundários: taninos, saponinas, cumarinas, limonoides, quassinoides, lactonas sesquiterpênicas, iridoides e alcaloides. Encontra-se também nos metabólitos secundários os pigmentos como os falvanóides, antocianinas e betalaínas, e os óleos voláteis como os monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides (Simões et al., 2017, p.24).

1.7 Relevância da pesquisa

A importância para a realização desta pesquisa se justifica por poucos estudos realizados com óleos essenciais e seus compostos como possibilidade de tratamento contra a *C. auris*. Há uma preocupação entre os profissionais de saúde sobre como identificar, controlar e tratar adequadamente a infecção, mas ainda são poucos estudos que apresentam resultados sobre a ação de medicamentos, em especial pela resistência apresentada aos antifúngicos conhecidos.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar *in vitro* a atividade de *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus citriodora*; *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Myristica fragans*, *Ocimum basilicum*, *Origanum majorana*, *Origanum vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia sclarea*, *Schinus terebinthifolius*, *Thymus vulgaris* e *Zingiber officinale*, bem como os compostos químicos dos óleos essenciais com as menores concentrações fungicidas mínimas sobre isolados biológicos de *Candida auris*

2.2 Objetivos específicos

- ✚ Determinar as concentrações fungicidas mínimas dos óleos essenciais de *C. cassia*, *E. citriodora*; *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M.alternifolia*, *M. fragans*, *O. basilicum*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. sclarea*, *S. terebinthifolius*, *T. vulgaris* e *Z. officinale*, sobre *C. auris*.
- ✚ Avaliar e determinar *in vitro* as concentrações fungicidas mínimas dos compostos químicos: α -Humuleno, β -Cariofileno, γ -Terpineno, Aldeído cinâmico, Borneol, Cânfora, Carvacrol, Eugenol, Isoeugenol, Linalool P-Cimeno, Terpeneol, Timol sobre as cepas de *C. auris*.
- ✚ Avaliar *in vitro* a atividade dos antifúngicos sintéticos Anfotericina B, Cetoconazol, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol sobre *C. auris*

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 *Candida auris*

Foram utilizados três isolados biológicos de origem humana, sem a presença de hifas e não produtoras de proteinase e fosfolipase, cedidas pelo Laboratório de Micologia e Parasitologia da Universidade Federal de São Paulo, Unifesp, mantidos em meio de cultura ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA).

3.2 Óleos essenciais e principais compostos químicos

Nesta pesquisa foram avaliados catorze óleos essenciais sobre as cepas de *Candida auris*: *C. cassia*, *M. fragrans*, *O. basilicum*, *O. majorana*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. sclarea*, *S. terebinthifolius* e *Z. officinale* adquiridos da empresa Ferquima® com parâmetros de qualidade: aparência, cor, pureza, odor, densidade - 20°C, índice de refração - 20°C; os óleos essenciais *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M. alternifolia*, *T. vulgaris* foram cedidos pela empresa World's Naturals Fragrances (WNF).

3.2.1 Compostos químicos dos óleos essenciais

As composições químicas dos óleos essenciais utilizados nesta pesquisa foram informadas pelas empresas:

- *C. cassia*: aproximadamente 80% de aldeído cinâmico 2% de cumarina, 2% de benzaldeído, 2% de álcool cinâmico e 2% de estireno (Ferquima®);
- *E. citriodora*: aproximadamente 93,99% de citronelal e 2,29% de β-citronelol (WNF);

- *E. globulus*: aproximadamente 80,50% de eucaliptol, 14,03% de limoneno, 2,58% de β -pineno, 1,72% de sabineno e 1,17% de α -terpineol (WNF);
- *E. caryophyllus*: aproximadamente 84,10% de eugenol, 12,67% de β -cariofileno, 1,51% de α -cariofileno e 1,08% de acetato de isoeugenol (WNF);
- *M. alternifolia*: aproximadamente 77,15% de terpineno-4-ol, 7,24% de γ -terpineno e 3,38% de terpinoleno (WNF);
- *M. fragans*: aproximadamente 25% de sabineno, 22% de α -pineno, 14% de β -pineno, 9% de miristicina, 4% de terpineno-4-ol e 4% de limoneno (Ferquima®);
- *O. basilicum*: aproximadamente 85% de metilchavicol (estragol), 3% de eucaliptol, 2,7% de berganoteno, 2% de transo cimento, 0,8% de linalol e 0,6% de eugenol (Ferquima®);
- *O. mahorana*: aproximadamente 22% de terpineno-4-ol, 16% de sabineno e 13% de γ -terpineno (Ferquima®);
- *O. vulgare*: aproximadamente 72% de carvacrol, 4,5% de γ -terpineno, 4% de p-cimeno, 4% de linalol e 2% de timol (Ferquima®);
- *R. officinalis*: aproximadamente 40% de 1,8 cineol, 15% cânfora, 13% α -pineno, 7% β -pineno e 3% de limoneno (Ferquima®);
- *S. sclarea*: aproximadamente 57% de acetato de linalila, 23% de linalol, 3% de α -terpineol, 2% de germacrene D e 2% de Sclareol (Ferquima®);
- *S. terebinthifolius*: aproximadamente 32% de γ -terpineno; 20% de d-limoneno, 15% de α -felandreno e 10% de α -pineno (Ferquima®);
- *T. vulgaris*: aproximadamente 62,13% de timol, 14,43% de cimeno, 8,49% de linalol, 5,98% de carvacrol, 2,55% de γ -terpineno, 2,37% de canfora, 2,15% de β -cariofileno e 1,34% de borneol (WNF);

- *Z. officinale*: aproximadamente 33% de α -zingibereno e 13% de β -sesquifelandreno (Ferquima®).

O composto químico aldeído cinâmico a 99,97% de pureza foi adquirido da empresa Quínari®.

Os compostos químicos α -Humuleno a 96%, β -Cariofileno a 80%, γ -Terpineno a > 95%, Borneol a 97,5%, Cânfora a 96%, Carvacrol a 98%, Eugenol a 99%, Isoeugenol a > 98,9%, Linalol a 97%, P-Cimeno a 99%, Terpeneol a >96%, Timol a 99,5% de pureza foram adquiridos da empresa Sigma.

Todos os óleos essenciais e compostos químicos foram adquiridos conforme disponibilidade nas empresas e foram mantidos em frasco âmbar, à temperatura ambiente.

3.3 Pesquisa da atividade dos óleos essenciais e principais compostos químicos sobre *C. auris*

3.3.1 Preparações da suspensão de leveduras

Os isolados de *C. auris* foram cultivados em ágar Sabouraud Dextrose (Difco – USA) e incubados em estufa a 37°C por 24 horas. A suspensão dos isolados de *C. auris* foram preparados a partir de uma cultura de 24 horas, com turbidez equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, concentração equivalente a $1-5 \times 10^6$ UFC/mL (Pfaller *et al.*, 1998). A 1 mL desta suspensão em PBS pH 7.2 acrescentou-se 9 mL do meio de cultivo RPMI-1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) ajustando-se a suspensão final para $0,5-2,5 \times 10^5$ UFC /mL.

3.3.2. Avaliação in vitro da atividade antifúngica dos óleos essenciais sobre isolados de C. auris

A pesquisa *in vitro* da atividade antifúngica dos óleos essenciais de *C. cassia*, *E. citriodora*, *E. globulus*, *E. caryophyllus*, *M. alternifolia*, *M. fragans*, *O. basilicum*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, *S. sclarea*, *S. terebinthifolius*, *T. vulgaris* e *Z. officinale*, foram realizados em microplacas de fundo chato, com 96 poços e capacidade de 300µl. Cada ensaio foi realizado em 24 poços, e em duplicata. Em cada poço, foi colocado uma solução de 100µl de meio RPMI – 1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) acrescido de tensoativo polissorbato Tween 20 (Sigma-Aldrich®). No primeiro poço foram colocados 200µl do óleo essencial a ser testado. No segundo poço foram colocados 100µl do mesmo óleo essencial e então este, foi homogeneizado e diluído em série, na base 2 até o 24º poço. Na sequência foram distribuídos em cada poço 100µl da suspensão de cada amostra de levedura. As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.3.3 Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos principais compostos químicos sobre isolados de *C. auris*

Foram preparadas suspensões de leveduras de cada cepa, conforme técnica descrita no item 3.3.1 e ensaio da atividade dos compostos químicos foi avaliada conforme técnica de microdiluição descrita no item 3.3.2.

3.4 Controles

- Controle negativo:

Em uma placa de microdiluição foi utilizado um controle negativo, para se observar a esterilidade do meio RPMI -1640 (Gibco BRL, Grand Island, NY, USA), um controle negativo dos óleos essenciais e compostos químicos.

- Controle positivo:

Em cada placa de microdiluição um controle positivo para cada levedura (meio de cultura + inóculo) testada.

As placas com controles também foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

3.5 Determinação da concentração inibitória mínima

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada na microplaca e confirmada em cultura no meio de ágar Sabouraud - dextrose (DIFCO). A CIM foi considerada a menor concentração do óleo essencial ou do composto químico estudado que impediu o crescimento visível de *C. auris*.

Os resultados de concentrações inibitórias mínimas (CIM) obtidos foram analisados segundo a variação dos valores de CIM para cada óleo essencial e composto químico, assim definidos:

- CIM-50 que representa a concentração inibitória mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.
- CIM-90 que representa a concentração inibitória mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

3.6 Avaliação da atividade fungistática e fungicida dos óleos essenciais e dos compostos químicos:

Também pode se expressar em termos de concentração fungicida mínima (CFM), considerada como a menor concentração da substância capaz de levar a morte do fungo (Cury,1997), após 24 horas.

A avaliação das atividades fungistática ou fungicida dos óleos essenciais e do composto químico foi realizada em placas de Petri com ágar Sabouraud Dextrose (DIFCO), semeando-se 5µl das diluições de cada poço para verificar a inibição do crescimento fúngico. As placas de Petri com os inóculos de cada poço da placa de microdiluição foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas.

Os resultados de concentrações fungicidas mínimas (CFM) obtidos foram analisados segundo variação dos valores de CFM: para cada óleo essencial:

- CFM-50 representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 50% das amostras testadas.
- CFM-90 representa a concentração fungicida mínima da substância capaz de inibir o crescimento de 90% das amostras testadas.

3.7 Ensaio da atividade antifúngica de Anfotericina B, Cetoconazol, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol.

3.7.1 Método E-Test® – Kit Comercial (AB-Biodisk, Solna, Suécia)

Este método foi utilizado na pesquisa de sensibilidade aos antifúngicos: Anfotericina B, Cetoconazol, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol.

3.7.1.1 Meio de cultivo

O meio RPMI 1640, ágar, MOPS, D-glicose, ágar (20,8g de RPMI-ágar-1640 (Gibco) e 1000,0 mL de água deionizada) foi ajustado para pH 7,0 com MOPS. Após esterilização por filtração, o meio foi distribuído em tubos, em volume de 25 mL e guardado a 4°C até o momento do uso. Os frascos contendo 25 mL de ágar dextrose foram esterilizados em autoclave a 120°C durante 15 minutos e guardado até o momento do uso.

3.7.1.2 Fitas E-Test®

As fitas foram adquiridas da AB BIODISK, com um gradiente de concentrações correspondendo Anfotericina B de 0,002 a 32 µg/mL; Cetoconazol de 0,002 a 32 µg/mL; Flucitosina de 0,002 a 32 µg/mL; Fluconazol de 0,16 a 256 µg/mL; Itraconazol de 0,002 a 32 µg/mL; Voriconazol de 0,002 a 32 µg/mL; sendo este gradiente identificado no verso da tira. As tiras E-Test® foram armazenadas em freezer a -20°C até serem utilizadas.

3.7.1.3 Preparo do Inóculo

As leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose (Difco) por 48 horas a 35°C. A suspensão foi preparada em 1 mL de água deionizada esterilizada e a densidade celular com turbidez equivalente à escala 1 de Mc Farland.

3.7.1.4 Determinação da concentração inibitória mínima

Os frascos contendo 25 mL de ágar dextrose foram fundidos, resfriados a 50°C e adicionados de 25 mL do meio de ágar RPMI-1640. A mistura homogeneizada contendo 50 mL foi vertida em placa de Petri esterilizada (15 mm x 15 mm). Após solidificação do meio as placas foram estocadas a 4°C. Antes da inoculação, as placas de ágar RPMI-1640 e as fitas de E-Test® foram mantidas por 30 minutos, a temperatura ambiente. Um volume de 0,6 mL referente a cada inóculo foi distribuído homogeneamente com o auxílio de *swab* sobre a superfície do ágar e as placas deixadas à temperatura ambiente por 15 minutos para completa absorção da suspensão pelo ágar. Decorrido este tempo, as fitas de E-Test® foram cuidadosamente colocadas sobre a superfície do ágar. As placas foram mantidas a 35°C durante 24-72 horas.

3.7.1.5 Determinação e interpretação do teste

As leituras da concentração inibitória mínima (CIM) foram realizadas em 24h e 48h para *C. auris* após a incubação, considerando-se o ponto de intersecção entre a fita e a zona onde o crescimento da levedura foi inibido.

3.8 Controles de qualidade e biossegurança

Durante a realização do projeto até a fase dos testes foram seguidas e respeitadas todas as normas de Ética e Biossegurança. Todas as preparações e análises foram realizadas pelos mesmos técnicos utilizando-se os equipamentos de proteção individual (EPIs) como luvas, avental, máscara,

óculos e equipamentos de proteção coletiva como cabine de segurança biológica, bico de Bunsen e capela de exaustão (OMS, 2004).

3.9 Descartes dos resíduos

Todos os resíduos gerados das coletas e análises microbiológicas seguiram as normas de descarte estabelecidas pelo plano de gerenciamento de resíduos do Instituto Adolfo Lutz.

4. RESULTADOS

4.1 Atividade *in vitro* dos catorze óleos essenciais sobre os isolados biológicos de *Candida auris*.

Os isolados biológicos de *C. auris* utilizados para avaliação da atividade dos óleos essenciais foram identificadas como isolado 1, isolado 2 e isolado 3.

Foram utilizados 14 diferentes óleos essenciais para avaliação *in vitro* da atividade antifúngica sobre os isolados 1, 2 e 3 de *C. auris* Tabela 1.

Tabela 1 - Concentração Fungicida Mínima dos catorze óleos essenciais sobre os isolados de *Candida auris*.

Óleos Essenciais	<i>Candida auris</i>	<i>Candida auris</i>	<i>Candida auris</i>
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
	*CFM µg/mL	*CFM µg/mL	*CFM µg/mL
<i>Cinnamomum cassia</i>	0,00001	0,10	0,05
<i>Eucalyptus citriodora</i>	5.475	2.737	21.900
<i>Eucalyptus globulus</i>	5.537	5.537	5.537
<i>Eugenia caryophyllus</i>	1.515	181,45	24.250
<i>Melaleuca alternifolia</i>	21,887	21,887	21,887
<i>Myristica fragans</i>	R	R	R
<i>Ocimum basilicum</i>	23.062	46.125	46.125
<i>Origanum majorana</i>	1.324	1.324	2.468
<i>Origanum vulgare</i>	752,34	188,08	3.009
<i>Rosmarinus officinalis</i>	20.212	10.106	80.850
<i>Salvia sclarea</i>	R	87.850	87.750
<i>Schinus terebinthifolius</i>	R	R	R
<i>Thymus vulgaris</i>	684,76	171,19	10.956
<i>Zingiber officinale</i>	R	R	R

Condições do estudo: Pesquisa da concentração fungicida mínima CFM em placas de microdiluição e após leitura em 24 horas: Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento atividade fungistática e ausência de crescimento atividade fungicida (CFM), resultado em µg/mL

*CFM: concentração fungicida mínima

R: Resistente – presença de crescimento a concentração máxima de cada óleo essencial

Os três isolados de *C. auris* foram resistentes aos óleos essenciais de *M. fragans*, na concentração de 171.500 µg/mL (100%), *S. terebinthifolius* na concentração de 170.400 µg/mL (100%) e *Z. officinale* na concentração de 71.200 µg/mL (100%).

Os três isolados foram sensíveis ao óleo essencial de *C. cassia*, sendo que o isolado 1 foi o mais sensível até a concentração CFM 0,00001µg/mL, o isolado 2 na concentração de CFM 0,10µg/mL e o isolado 3 na concentração de CFM 0,05µg/mL.

Para o óleo essencial de *S. sclarea* ocorreu resistência do Isolado 1. Os isolados 2 e 3 foram inibidos até a concentração de CFM de 87.750 µg/mL.

O isolado 2 foi sensível para os óleos essenciais de *E. citriodora*, *E. caryophyllus*, *O. vulgare*, *R. officinalis*, e *T. vulgaris*.

4.2 Atividade dos compostos químicos α-Humuleno a 96%, β-Cariofileno a 80%, γ-Terpineno a > 95%, Aldeído cinâmico a 99,97%, Borneol a 97,5%, Cânfora a 96%, Carvacrol a 98%, Eugenol a 99%, Isoeugenol a > 98,9%, Linalol a 97%, P-Cimeno a 99%, Terpeneol a >96%, Timol a 99,5% de pureza, sobre as cepas de *Candida auris*.

Os isolados biológicos apresentaram maior sensibilidade aos óleos de *C. cassia*, *E. caryophyllus*, *T. vulgaris*. Estes então foram selecionados para que seus principais compostos químicos também fossem testados quanto sua atividade antifúngica.

O óleo essencial de *C. cassia* tem como principais compostos químicos em sua composição: aldeído cinâmico, cumarina, benzaldeído, álcool cinâmico e estireno. O composto químico aldeído cinâmico é o mais estudado e encontrado em maior quantidade no óleo essencial de *C. cassia*. O composto químico aldeído cinâmico foi adquirido pela Quínari® com grau de pureza de 99,97%.

Para a avaliação da atividade antifúngica dos compostos químicos do óleo essencial de *E. caryophyllus*, foram adquiridos os compostos químicos

da empresa Sigma- Aldrich com os seguintes graus de pureza: α -humuleno a 96%, β -cariofileno a 80%, eugenol a 99% e isoeugenol a > 98,9%.

Para a avaliação da atividade antifúngica dos compostos químicos do óleo essencial de *T. vulgaris*, foram adquiridos os compostos químicos da empresa Sigma- Aldrich® com os seguintes graus de pureza: β -cariofileno a 80%, γ -terpineno a > 95%, borneol a 97,5%, cânfora a 96%, carvacrol a 98%, linalol a 97%, P-cimeno a 99%, terpineol a >96%, timol a 99,5%.

A atividade antifúngica dos compostos químicos sobre os isolados de *C. auris* estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Concentração Fungicida Mínima dos compostos químicos α -Humuleno a 96%, β -Cariofileno a 80%, γ -Terpineno a > 95%, Aldeído cinâmico a 99,97%, Borneol a 97,5%, Cânfora a 96%, Carvacrol a 98%, Eugenol a 99%, Isoeugenol a > 98,9%, Linalol a 97%, P-Cimeno a 99%, Terpineol a >96%, Timol a 99,5% de pureza sobre isolados biológicos de *Candida auris*.

Composto químicos	<i>Candida auris</i> Cepa 1	<i>Candida auris</i> Cepa 2	<i>Candida auris</i> Cepa 3
	*CFM ($\mu\text{g/mL}$)	*CFM ($\mu\text{g/mL}$)	*CFM ($\mu\text{g/mL}$)
α -Humuleno	R	R	R
β -Cariofileno	R	R	R
γ -Terpineno	R	R	R
Aldeído cinâmico	0,026	0,83	3,33
Borneol	101.050	50.252	50.525
Cânfora	52.925	26.462	13.321
Carvacrol	714,84	357,42	1,39
Eugenol	813,67	406,83	3.254
Isoeugenol	1,60	1,60	12,82
Linalol	3.142	6.284	12.568
P-Cimeno	R	R	R
Terpineol	1.571	12.575	1.571
Timol	2,93	1,46	11,74

Condições do estudo: Pesquisa de Concentração Fungicida Mínima (CFM) em placas de microdiluição e leitura em 24 horas. Pesquisa da atividade fungistática e fungicida em Ágar Sabouraud dextrose e leitura em 24 horas: presença de crescimento - atividade fungistática e ausência de crescimento - atividade fungicida, resultado em $\mu\text{g/mL}$.

*CFM: concentração fungicida mínima

R: Resistente – presença de crescimento a concentração máxima de cada composto químicos

Os três isolados foram resistentes aos seguintes compostos químicos: α -humuleno, β -cariofileno, γ -terpineno e p-cimeno.

Os três isolados apresentaram sensibilidade ao composto químico aldeído cinâmico, presente no óleo essencial de *C. cassia*. O isolado 1 apresentou sensibilidade até a CFM de 0,026 $\mu\text{g/mL}$. O isolado 2 apresentou sensibilidade até a CFM de 0,83 $\mu\text{g/mL}$ e o isolado 3 até a CFM de 3,33 $\mu\text{g/mL}$.

Em relação à atividade do composto químico isoeugenol presente no óleo essencial *E. caryophyllus*, os isolados 1 e 2 apresentaram inibição até a CFM de 1,60 $\mu\text{g/mL}$. O isolado 3 apresentou sensibilidade até a CFM de 12,82 $\mu\text{g/mL}$.

O terceiro composto que apresentou ação inibitória sobre os isolados foi o Timol, presente nos óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* com a melhor atividade inibitória *in vitro* no isolado 2 até a CFM de 1,46 $\mu\text{g/mL}$. O isolado 1 apresentou CFM de 2,93 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o isolado 3 CFM de 11,74 $\mu\text{g/mL}$.

4.3 Sensibilidade da *C.auris* aos antifúngicos sintéticos – anfotericina B, cetoconazol, flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol, utilizando as Fitas E-Test®

Para avaliação da sensibilidade da *C. auris* aos antifúngicos sintéticos: anfotericina B, cetoconazol, flucitosina, fluconazol, itraconazol e voriconazol as placas foram examinadas após 48 horas para identificação do halo de inibição, conforme apresentado na Tabela 3.

Tabela 3 – Valores da CIM para Anfotericina B, Cetoconazol, Flucitosina, Fluconazol, Itraconazol e Voriconazol, utilizando as Fitas E-Test®, leitura em 48 horas

Isolados de <i>Candida auris</i>	Anfotericina B	Cetoconazol	Flucitosina	Fluconazol	Itraconazol	Voriconazol
	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)	CIM (µg/ml)
1	0,50	3	2	R	4	R
2	0,75	3	1,0	R	4	R
3	0,50	4	1,5	R	4	R

Condições do estudo: Pesquisa da Concentração inibitória mínima CIM. utilizando as Fitas E-Test® e leitura em 48 horas: resultado em µg/mL

*CIM: concentração inibitória mínima

Foi identificada a resistência dos três isolados para os antifúngicos sintéticos fluconazol e voriconazol. Os isolados de *C. auris* foram mais sensíveis ao antifúngico sintético anfotericina B.

5. DISCUSSÃO

5.1 Atividades de óleos essenciais

Os óleos essenciais são utilizados em pesquisa há anos quanto a atividade antifúngica, antiparasitária e antiviral. O mecanismo de atividade destes óleos essenciais depende da composição química, formada na maioria por compostos terpênicos, constituintes aromáticos e alifáticos (Gucwa et al., 2018).

São conhecidos cerca de 100.000 metabólitos secundários provenientes de plantas, mas considerando que há limitação de rotas biossintéticas para a síntese destes metabólitos, os produtos naturais são classificados em número limitado de grupos. Pode-se citar quatro origens biossintéticas de classes de metabólitos secundários: Acetil-CoA que origina os poliacetilênicos, policetídeos, flavanoides e estilbeos; os aminoácidos que originam as aminas, os alcalóides verdadeiros, os glicosinolatos e os glicosídeos cianícos; 1-desóxi-D-xilulose que originam os tetraterpenos, o bloco de construção dos hemiterpenos, os diterpenos e nos monoterpenos; mevalonato que origina os triterpenos e esteroides e os sesquiterpenos e ácido cinâmico que origina as cumarinas, fenilpropanoides e ácido fenil carboxílicos. Os compostos terpênicos, bem como os alcalóides e compostos fenólicos são metabólitos secundários em plantas e a origem depende da relação biossintética entre o metabolismo basal e especial da planta. Os monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos tetra e pentacíclicos esteróides, caractenoides e xantofilas são metabólitos especiais de origem do metabolismo basal de isopentenildifosfato. (Kreis, Munkert e de Pádua *in* Simões, 2017).

5.2.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides são os compostos mais abundantes nas análises de óleos essenciais, estando presentes como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos e derivados. Os terpenos são ativos contra

vários microrganismos e possuem atividade antimicrobiana, pelo caráter lipofílico, resultando na alteração da permeabilidade da membrana (Trombeta et al., 2005).

A classificação dos terpenos é baseada pela quantidade de isoprenos, que são estruturas básicas formadas por carbonos, sendo denominadas como isoprenos ou hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterpenos, trieterpenos, tetraterpenos e polisoprenopóides (Matos et al., 2019; Bakkali et al., *apud* Contieri, 2017).

Os terpenos são substâncias de origem vegetal formados pela condensação de unidades de isoprenos (Gucwa et al., 2018). Há descrição de atividades dos terpenos como agentes terapêuticos com atividades antiinflamatória, cicatrização de feridas e como antineoplásicos (Matos et al., 2019). São exemplos de terpenos a cânfora e o timol.

Os monoterpenos são descritos com possibilidade de exercer atividades antimicrobiana, com a capacidade de interferir na integridade da membrana celular e seu funcionamento, alterando o potencial da membrana e causando inibição da cadeia respiratória (Santos, 2016). São exemplos de monoterpenos, e que foram utilizados para este estudo o γ -terpineno, o terpineol, o linalol e o carvacrol. O carvacrol é um fitoquímico, já estudado como não tendo efeito citotóxico ou mutagênicos em células humanas (Shaban, Pahel e Ahmad, 2020).

Os terpenóides são derivados dos terpenos contendo oxigênio, como o borneol (Gucwa et al., 2018).

São exemplos de sesquiterpenos o α -humuleno e o β -cariofileno, que também possuem ação antimicrobiana e herbicida (Santos, 2016).

5.2.2 Alcaloides

Para a maioria dos alcaloides a formação vem da derivação de aminoácidos, sendo eles: ornitina, arginina, lisina, fenilalanina, tirosina e triptofano, que por descarboxilação formam uma amina biogênica que irá promover a biossíntese do alcaloide. No entanto, outros alcaloides, como os

acridônicos, esteroidais, imidazólicos e púricos não seguem a regra de biossíntese por um aminoácido (Simões et al, 2017. p. 160).

Os alcaloides são metabólitos secundários reconhecidos pela atividade farmacológica, apresentando a característica de neurotransmissor, com papel de regulação, estimulação e indução de funções de acordo com a capacidade de interagir com alvos biológicos (Oliveira, 2018).

5.2.3 Fenóis

Os fenóis ou compostos fenólicos estão presentes em legumes e vegetais, sendo já caracterizados milhares de compostos de características moleculares simples a complexas, com estudos da atividade antioxidante e antimicrobiana (Santos, 2016).

São compostos formulados pela via biossintética do ácido chiquímico, em que a estrutura possui fator determinante para a atividade antirradical livre e quelantes de metais. Essa atividade antioxidante dos compostos fenólicos ácidos aumenta com o grau de hidroxilação. Essa condição antioxidante favorece a atividade antimicrobiana (Scherer et al., 2009). São exemplos de compostos fenólicos o eugenol (composto fenólico) e o isoeugenol.

Terpenoides fenólicos como o timol e o carvacrol são reconhecidos por apresentar estruturas isoprênicas. Já compostos como os ácidos cinâmicos aromáticos e fenólicos são estruturas químicas que não permitem inferir na biossíntese (Kreis, Munkert, de Pádua *in* Solimões et al., 2017. p. 160).

Pela composição química a atividade antimicrobiana pode ser atribuída ao conjunto dos compostos, devido a característica de ser lipofílico, permitindo a atividade na membrana celular e causar danos estruturais, podendo causar degradação da parede celular e danos nas proteínas ocasionando extravasamento celular (Contieri, 2017).

Quatro compostos têm atraído o interesse de pesquisadores devido à atividade com potencial fungicida e antivirulência em espécies de *Candida*, o eugenol, metileugenol, carvacrol e timol, sendo estes dois últimos com efeitos inibitórios contra hifas e formação de biofilme em espécies de *Candida*. A necessidade de produtos farmacológicos com menor toxicidade, a redução da

resistência aos antifúngicos já utilizados além de melhorar a eficácia dos tratamentos, faz com que a busca por novas possibilidades terapêuticas sejam testadas, incluindo estudos com compostos fenólicos que possuem atividade sinérgica com antifúngicos *in vitro* mesmo em isolados resistentes (Shaban, Pahel e Ahmad, 2020).

No estudo realizado por Shaban, Phael e Ahmad (2020) foi possível identificar uma alta atividade antifúngica do óleo essencial *C. cassia*. Neste estudo os autores também identificaram que o carvacrol foi o composto mais ativo, com CIM mais baixa e atividade anti-aderência, justificando que o carvacrol reduz a capacidade de aderência de *C. auris* e a diminuição de produção de proteinase pela célula fúngica. A capacidade de adesão de *C. auris* é dada pela produção de adesinas ou glicoproteínas de superfície e o carvacrol pode apresentar uma atividade de bloqueio nessas adesinas interferindo na síntese e assim pode reduzir a capacidade de aderência do fungo às células hospedeiras.

Nesta pesquisa, os três isolados de *C. auris* testados apresentaram as menores CFM para o óleo essencial de *C. cassia*, semelhante aos resultados apresentados por Shaban Phael e Ahmad (2020), assim como quando testados os principais compostos químicos dos óleos essenciais o composto químico carvacrol, destacou-se por apresentar uma das menores CFMs entre os compostos avaliados.

Carvacrol (C₁₀H₁₄O - 5-Isopropil-2-metilfenol; 2-Metil-5-(1-metiletil) fenol) é um monoterpeneo natural, abundante em plantas pertencentes à família Lamiaceae, componente importante de vários óleos essenciais de plantas, tais como *Origanum* spp., *Satureja hortensis*, *Thymus* spp. e *Timbra capitata*. Recentemente atraiu muita atenção pelas diversas propriedades biológicas (antioxidante, anti-inflamatório, neuro protetor, antitumoral, antibacteriano entre outras). No entanto, o carvacrol tem propriedades físico-químicas (baixa solubilidade em água e alta volatilidade), que dificultam seu potencial uso farmacológico. O mecanismo de ação de do carvacrol, é a inibição da biossíntese do ergosterol (Marinelli et al., 2019).

Vinciguerra et al. (2018), avaliaram os óleos essenciais de *O. vulgaris*, *T. vulgaris* e o composto carvacrol contra *Malassezia furfur* e identificaram valores de concentrações inibitórias mínimas variando de 450 a 900µg/mL

Lima et al. (2013) identificou atividade antifúngica do carvacrol contra cepas de *C. albicans* com CFM de 512µg/mL, sendo evidenciada principalmente sobre o ergosterol, na ligação de esteróis na membrana da levedura e não atua na modificação da parede da célula fúngica

Em um estudo de Gucwa et al. (2018), foi identificada atividade do óleo essencial *C. cassia* que inibiu o crescimento de cepas de *C. albicans* e *C. glabrata*. Esses autores ainda relataram que o aldeído de canela é o elemento essencial na atividade antifúngica do produto. Os autores ainda relataram que ocorreu alta atividade antifúngica dos óleos essenciais de *T. vulgaris*, *C. cassia*, *O. basilicum* e *E. caryophyllus* entre outros estudados, com observação de concentração máxima para uso potencial em preparações para aplicação externa ou inalação. Os resultados antifúngicos do óleo de canela advém da composição, sendo o aldeído crucial para a atividade antifúngica.

Nesta pesquisa, os óleos essenciais de *C. cassia*, *E. caryophyllus*, *O. basilicum* e *T. vulgaris* apresentaram as menores concentrações inibitórias entre os óleos essenciais estudados, sendo o óleo essencial de *C. cassia* e *T. vulgaris*, os que obtiveram as menores CFMs. Entre os compostos estudados, o aldeído cinâmico, encontrado no óleo essencial de *C. cassia*, o isoeugenol, encontrado no óleo essencial de *E. caryophyllus* e o timol, encontrado no óleo essencial de *T. vulgaris*, apresentaram as menores CFMs sobre os isolados de *C. auris*.

O aldeído cinâmico também é conhecido com outros sinônimos: (E) - ácido 3-fenil-2-propenóico; ácido cinâmico; ácido trans; cinâmico, ácido fenilacrílico; ácido 3-fenilacrílico. A fórmula molecular: C₉H₈O₂; massa molecular: 148,17g/mol. É um composto fenólico presente com propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias. O cinamaldeído presente na canela, é um líquido amarelado e oleoso, ligado principalmente ao óleo essencial e está presente em grande quantidade nesta planta. É o principal composto que

confere o aroma amadeirado da canela (Gruenwald et al., 2010; Singh, 2018). É considerado um antioxidante potente, atuando na redução dos níveis de LDL (lipoproteína de baixa densidade), devido a esse fato, o consumo é recomendado por estar relacionado com a diminuição do risco de algumas doenças como certos cânceres e doenças cardiovasculares (Auger et al., 2004).

Sendo utilizado em várias áreas como a cosmética como aromatizante, é muito empregado em produtos alimentícios e bebidas e também na área farmacêutica. Estudos apontam que o aldeído cinâmico apresenta atividades fungicida, larvicida, anti-inflamatória e antibiótica sobre bactérias Gram positivas e Gram negativas, além de apresentar efeitos hipoglicemiante em ratos, devendo o mecanismo de ação ainda ser estudado para melhor esclarecimento (Figueiredo et al., 2017; Chemicalize, 2020).

Acredita-se que o cinamaldeído iniba a atividade de beta-1,3-glucano e da quintina sintase, enzimas responsáveis pela produção de componentes da parede celular fúngica. No entanto já sobre a atividade do óleo de manjeriço na parede celular fúngica, não possui tanta investigação (Gucwa et al., 2018).

Hang, Graham e Adukwu (2020) pesquisaram o efeito antifúngico da *Cinnamomum zeylanicum* Blume, conhecida popularmente como canela do Sri Lanka, cultivada na região da Índia descrevem que os óleos essenciais extraídos das folhas e da casca tem efeitos antissépticos, imunoestimulantes, desintoxicantes, analgésicos e antidepressivos. Este estudo descreve que o extrato desta planta exibe atividade antifúngica mais alta que a Anfotericina B em patógenos orais.

Os pesquisadores descrevem que o óleo essencial da casca tem efeito antimicrobiano mais eficaz que o óleo extraído da folha (Hang, Graham e Adukwu, 2020). Quanto a composição o óleo extraído da casca possui maior concentração de *trans*-cinnamaldeído (66,43% na casca enquanto na folha a concentração é de 1,92%), já o óleo extraído da folha possui 62,57% de eugenol enquanto na casca há 5,28%. Os autores identificaram que os óleos alteraram a permeabilidade da membrana celular, outro estudo propõe que a parede e a membrana celular são os locais-alvo de *trans*-cinnamaldeído e

eugenol, podendo ser a atividade devida às propriedades lipofílicas desses compostos. O estudo ainda descreveu a possibilidade de atividade de inibição de fatores de hemolisina. Por fim, concluem que pesquisas sobre a atividade destes óleos essenciais podem ser um campo de pesquisa para intervenções terapêuticas antifúngicas.

Isoeugenol (2-Methoxy-4-propenilfenol) possui fórmula química: $C_{10}H_{12}O$, peso molecular 164,2 g/mol é preparado a partir do eugenol por aquecimento. O eugenol é utilizado na produção de isoeugenol para a fabricação de vanilina. Eles são usados na formulação para atração de insetos e absorção de UV, analgésicos, biocidas e antissépticos (Abourashed et al., 2008). O isoeugenol é o principal componente da baunilha natural derivada do corpo frutífero da espécie de orquídea *Vanilla planifolia* de cultivo difícil e processo de extração pouco rentável, tornando o produto com custo elevado, entre US\$ 1.200 a US\$ 4.000 por quilo, em contraste com a vanilina sintética de custo inferior a US\$ 15,00. Desde 1874, procuram-se formas de sintetizar a vanilina utilizando o eugenol para comercialização a preços mais baixos (Pacheo e Damasio, 2010).

Quimicamente, o isoeugenol é utilizado como material de partida na obtenção da vanilina, utilizada como aromatizante em alimentos, em cosméticos e produtos farmacêuticos (Havkin-Frenkel & Belanger, 2008). Ele pode ser facilmente extraído do óleo essencial de cravo, de baixo custo por ser produzido em várias regiões (Ashengroph et al., 2011).

Pinto et al. (2019), avaliaram a atividade antifúngica e citotóxica de *E. caryophyllus*, eugenol, isoeugenol e methylisoeugenol contra *Microsporium canis*, *M. gypseum*, indicando uma bioatividade antifúngica de isoeugenol e methylisoeugenol e baixo efeito citotóxico *in vitro* sobre uma linhagem não tumoral de células (células Vero). Zhou et al. (2019), analisaram a atividade do carvacrol e isoeugenol contra *Rhizopus stolonifer* e *Absidia coerulea* com potenciais efeitos antifúngicos, indicando que poderiam ser utilizados no desenvolvimento de novos fungicidas biológicos. Isoeugenol também foi avaliado contra cepas de *Penicillium citrinum* observando seu potencial

antifúngico. O isoeugenol apresenta baixo risco de irritação e tumorigênico (Ferreira et al., 2018).

Medeiros et al. (2020) avaliaram a atividade antifúngica do isoeugenol e das acetamidas híbridas, obtidas a partir do isoeugenol, contra *C. albicans* isoladas de cavidade oral. A CIM e CFM do isoeugenol variaram entre 128 e 256 µg/mL, sendo capaz de interferir na formação das estruturas como clamidoconídeos e pseudo-hifas, importantes no processo patogênico da espécie.

O timol (C₁₀H₁₄O - 2-isopropil-5-metil-fenol) é um monoterpene, componente importante em várias espécies de plantas, em particular *T. vulgaris*, e reconhece-se por ter um número de propriedades farmacológicas, incluindo a atividade antimicrobiana e antifúngica, o que pode envolver efeitos sobre a membrana celular (Braga e Ricci, 2011).

Teixeira et al. (2018), verificaram a atividade antifúngica do timol contra isolados biológicos de origem humana de *C. neoformans* e identificaram a interação desse monoterpene com esteróis, com valores de CFM que variaram entre 40 e 101 µg/mL, supondo que o timol interaja com o ergosterol, mas não com o colesterol.

Miranda-Cadena et al. (2021) desenvolveram e caracterizaram nanopartículas de carvacrol, cinamaldeído, citral e timol à base de lipossomos para testar a atividade anti-*Candida*. Nanopartículas com 64µg/ml de cinamaldeído, 256µg/ml de citral e 128µg/ml de timol apresentaram as melhores características entre as formulações testadas. O carvacrol e o timol nas nanopartículas à base de lipossomas não eram tóxicos, independentemente da concentração. Além disso, o carvacrol e o timol mantiveram a atividade antifúngica após o encapsulamento e houve uma redução significativa (~ 41%) da sobrevivência da levedura quando os macrófagos foram incubados com lipossomas de carvacrol ou timol.

Pinto et al. (2009) descrevem a atividade antifúngica do eugenol prejudicando a biossíntese do ergosterol. O ergosterol é o principal componente do esterol da membrana celular fúngica, sendo responsável pela manutenção da função e integridade celular.

Os óleos essenciais possuem mecanismos de ação semelhantes aos antimicrobianos sintéticos, causando danos à membrana celular, além de influenciar nas atividades celulares como a produção de energia. Outro efeito possível dos óleos essenciais é a coagulação do conteúdo celular, com extravasamento do citoplasma e morte celular (Gucwa et al., 2018).

Szweda et al. (2015) analisaram que a atividade antifúngica dos óleos essenciais de lavanda, limão, árvore do chá, manjeriço, tomilho, gerânio, canela e cravo foi promissora para isolados de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*.

Shaban, Patel e Ahmad (2020) ainda avaliaram os fatores de virulência de 25 isolados de *C. auris*. e a atividade antifúngica sobre a *C. auris* dos fenóis monoterpênicos, carvacrol, timol, eugenol e metil eugenol com a combinação com quatro antifúngicos. Os autores identificaram que o carvacrol foi o mais eficaz com valores de CIM de 125 µg/ml, seguido do timol com CIM de 312 µg/ml. Ao fazer a combinação com antifúngicos sintéticos identificaram efeito sinérgico do carvacrol com fluconazol, sendo que todos os isolados se mostraram resistentes ao fluconazol. Com a anfotericina B o efeito sinérgico foi com 28% dos isolados estudados, sendo que destes 12% foram resistentes a anfotericina B. Com a combinação com a nistatina 28% apresentaram efeito sinérgico, sendo todos resistentes a nistatina. Por último a combinação com caspofungina, apresentou efeito sinérgico apenas em um isolado sendo este resistente a caspofungina. Os pesquisadores avaliaram microscopicamente os isolados e relatam que não houve observação de hifas ou pseudo-hifas nos isolados de *C. auris*. Ainda identificaram que o carvacrol reduziu a capacidade de aderência da *C.auris*, sendo essa capacidade possivelmente reduzida devido ao fato do carvacrol ter bloqueado adesinas ou glicoproteínas de superfícies, reduzindo a capacidade de aderência às células hospedeiras. Ainda identificaram detecção em 96% dos isolados de produção de proteinase, mas com redução significativa desta produção pelo carvacrol.

Gucwa et al. (2018) sugerem que ocorra sinergismo do carvacrol e do timol com o fluconazol para alguns isolados do gênero *Candida*, sendo esse último também com ação sinérgica com a anfotericina B.

5.2 Atividade enzimática

A produção de exoenzimas reflete o grau de patogenicidade de um microrganismo. A exoenzima fosfolipase atua na hidrólise dos fosfolipídios dando origem a lisofosfolipídios que causam danos à célula epitelial levando a lise celular (Santangelo et al., 1999). Além disso, destrói substâncias surfactantes nos pulmões, facilitando a adesão da levedura (Karkowska-Kuleta et al., 2009).

A exoenzima proteinase degrada tecidos do hospedeiro e destroem queratina, colágeno, albumina, fibronectina, hemoglobina e proteínas da matriz extracelular bem como proteínas importantes para o sistema imune, digerindo as imunoglobulinas e parte do sistema complemento no local da infecção (Casadevall e Perfect, 1998). Campos e Baroni (2010), relataram que quanto maior o potencial de virulência manifestado nos diferentes mecanismos dessa virulência utilizados pelo microrganismo, associado a quadros de imunodepressão do hospedeiro, aumenta a possibilidade de penetração da levedura e consequente infecção dos diferentes tecidos do paciente.

Vários fatores de virulência associado às cepas de *Candida* são associadas as características responsáveis pela capacidade da levedura sobreviver facilmente e persistir em diversos ambientes, principalmente os propícios a infecções (Tsang et al., 2007). A presença de produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase foram demonstradas em isolados de *C. auris* em estudo realizado por Kumar et al. (2015). Enzimas hidrolíticas extracelulares, como as fosfolipases, atuam como importantes fatores de virulência, auxiliando na aderência e invasão das células hospedeiras.

Neste estudo, os isolados de *C. auris* não apresentaram produção das exoenzimas proteinase e fosfolipase antes e após exposição aos óleos essenciais *E. caryophyllus* e *T. vulgaris* e seus compostos químicos. Larkin et al. (2017) observaram em estudo *in vitro* que a produção de exoenzimas em diferentes isolados de *C. auris*, de diferentes regiões geográficas, mostraram

que a produção de proteinase foi detectada em 64% e da fosfolipase, em 37,5% dos isolados testados. Larkin et al. (2017) ainda explica que estes fatores são menos evidentes em *C. auris* quando estudados *in vitro*, com variação significativa na produção das referidas exoenzimas, assim como dependendo da cepa estudada.

Outro fator de virulência significativo envolvido em *C. auris* é a sua capacidade de aderir diferencialmente a superfícies poliméricas, formar biofilmes e resistir a agentes antifúngicos (Sherry et al., 2017).

No entanto, Larkin et al. (2017), relatam que os biofilmes de *C. auris* são significativamente mais finos em espessura em relação ao biofilme de *C. albicans*. Além disso, *C. auris* exibe capacidade mínima para aderir ao elastômero de silicone (um material representativo do cateter) em relação a *C. albicans*. A fraca capacidade de adesão da *C. auris* sugere que é provável que desempenhe algum papel na candidíase, mas não significativo, em contraste com que são conhecidos para *C. albicans* e *C. parapsilosis*.

C. auris também demonstra termo tolerância, crescendo otimamente a 37°C e manutenção da viabilidade até 42 °C, tolerância ao sal e agregação celular em grandes grupos, o que pode sugerir alguma vantagem na proliferação em ambiente hospitalar (Borman et al., 2016; Satoh et al., 2009).

5.3. Atividade de antifúngicos sintéticos

Segundo Rossi (2009) ainda não há evidência de que os fungos são capazes de inativar ou modificar agentes antifúngicos, e dessa maneira adquirir resistência. No entanto, a utilização profilática de azóis, em especial o fluconazol na prevenção de infecções causadas por *Candida* aumentou a resistência a este antifúngico, com mutação do gene ERG11 e super expressão dos genes CDR1 e CDR2. Kumar et al. (2021), relatam que os azoles são drogas de primeira escolha em infecções sistêmicas causadas por espécies de *Candida* por ter como alvo a via da biossíntese do ergosterol ao

inibir a 14 α -desmetilase codificada por ERG11. Mas em análises de *C. auris* identificaram serem resistentes aos azóis por mutação desse gene (ERG11).

Du et al. (2020) relatam que foram encontradas três mutações em ERG11 de *C. auris* resistente ao fluconazol.

Em relação às equinocandinas pode ser raro encontrar isolados resistentes, mas quando presentes estão ligados à mutação do gene FKS1, que codifica a enzima beta 1,3 D-glucana sintetase. Por fim, o mecanismo de resistência à anfotericina B provavelmente está associada ao aumento ou diminuição de ergosterol na membrana celular (Du et al., 2020 e Rossi, 2009).

De acordo com o CDC-USA, as infecções sistêmicas causadas por isolados de *Candida* entre os anos de 2012 a 2016, foram resistentes a antifúngicos de primeira linha como fluconazol e equinocandinas (Wijesinghe et al. 2020).

A natureza da resistência antifúngica de *C. auris* ainda é desconhecida. O número de antifúngicos disponíveis para o tratamento atualmente é muito limitado, sendo quase todos pertencentes às classes de azólicos, polienos, equinocandinas e alilaminas. Um grande problema é o não atendimento a expectativas de tratamento, muitos por sua toxicidade e pela via de administração, exigindo necessidade de aplicação em ambiente intra-hospitalar (Hata, Humphries e Lockhart, 2020; Szweda, 2015).

Os isolados de *C.auris*, tem mostrado resistência as principais classes de antifúngicos (azóis, polienos e equinocandinas). As infecções têm sido tratadas com o uso de equinocandinas, que estão sendo recomendadas como primeiras linhas de tratamento, associadas em alguns casos com anfotericina B. Esta quando utilizada sem combinação tem mostrado falha no tratamento (Rodhes e Fischer 2019; Spivak e Hanson, 2018; Shaban, Pahel e Ahmad, 2020). Chakrabarti e Sood (2021) no entanto apresentam em seu estudo que já há resistência à equinocandina sendo observada em alguns países.

De acordo com as orientações CDC-USA todos os isolados de *C. auris* devem ser submetidos a testes de sensibilidade de antifúngicos, pois os níveis de resistência podem variar. Por não haver um ponto de corte específico para *C.auris*, os pontos são definidos de acordo com os estabelecidos para a

espécie *Candida*. Os pontos de corte que então definidos são: fluconazol CIM ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$; Anfotericina B CIM ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$.

Hata, Humphries e Lockhart (2020), relatam que há ainda grande dificuldade de interpretar a sensibilidade reduzida a azóis, polienos e equinocandinas porque não foi ainda definido um ponto de corte pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) ou pelo Comitê Europeu de Teste de Susceptibilidade Antimicrobiana.

Os dados do CDC – USA apresentam que alguns isolados dos Estados Unidos são resistentes às três classes antifúngicas (triazol, polieno e equinocandinas), além de identificar que 90% dos isolados foram resistentes ao fluconazol, 30% à anfotericina B e menos de 5% às equinocandinas (Chakrabarti e Sood, 2021). Esses autores ainda relatam que variação de resistência de acordo com os clados, citando que o clado II mostrava maiores taxas de sensibilidade ao fluconazol (de até 86%) enquanto o clado I apresentava maior resistência (97%).

Spivak e Hanson (2018) relataram que apesar do tratamento ideal ainda não estar definido, a maioria dos isolados de *C.auris* se mostraram sensíveis às equinocandinas, podendo ser alternativa para o tratamento inicial.

Não é possível ainda, por falta de evidências, determinar qual a melhor terapia para a infecção por *C. auris*, que frequentemente é multirresistente. Por essa característica pode ser possível a avaliação de uma terapia combinada com mais de um antibiótico (Bidaud et al., 2019).

Arendrup et al. (2017), testaram 123 isolados de *C.auris* e oito antifúngicos, descrevendo resistência ao fluconazol e sensibilidade variada à anfotericina B. Tsay et al. (2018) descrevem a avaliação de 54 isolados de *C. auris* identificando que 93% eram resistentes ao fluconazol, 35% eram resistentes à anfotericina B e 7% às equinocandinas. Szeweda et al., demonstraram que muitas espécies de *Candida* são resistentes ao fluconazol e outros azóis, além da resistência também apresentada à flucitosina.

O'Brien et al. (2020), testaram 15 isolados de *C. auris*, com mais de 12.000 leituras de CIM de diferentes combinações de antifúngicos:

anfotericina B, anidulafungina, caspofungina, micafungina, voriconazol, isavuconazol, posaconazol e itraconazol, identificando que a flucitocina potencializou as combinações de maior eficácia com outras drogas. Os autores não avaliaram combinações com fluconazol devido à resistência encontrada nos isolados.

Um estudo feito por Kim et al. (2019) estudaram como a Hsp90 de *C. auris* interfere sobre a resistência ao fluconazol, permitindo a evolução da resistência a medicamentos. O Hsp90 é um regulador chave das características de virulência do gênero *Candida*. O comprometimento da função pode anular a resistência aos medicamentos, atenuando a virulência (O'Meara, Robbins e Cowen 2017). Com a inibição da Hsp90 houve diminuição a tolerância ao azol de isolados de *C. auris*, transformando a atividade do fluconazol de fungistático para fungicida, sugerindo que a inibição da Hsp90 prejudica a sobrevivência do fungo (Kim et al, 2019).

De acordo com Shaban, Patel e Ahmad (2020), que avaliaram antifúngicos sobre isolados de *C. auris*, a classificação de acordo com as diretrizes do CDC-USA os pontos provisórios de CIM são de resistência quando ≥ 32 $\mu\text{g/ml}$ para Fluconazol e ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$ para Anfotericina B.

Szekely et al. (2019) avaliaram linhagens de *C. auris* sobre sensibilidade a antifúngicos *in vitro*. Este estudo avaliou 175 isolados provenientes da Índia e da África do Sul. Os medicamentos utilizados foram: anfotericina B, Nistatina, Isavuconazol, itraconazol, posaconazol, fluconazol, flucitosina, anidulafungina e voriconazol, utilizando tiras de gradiente de Etes (provenientes da BioMérieux UK Ltd.). Os autores relatam que não há ainda como determinar significativamente um ponto de corte de CIM para isolados de *C.auris*. Foram identificados dados de resistência ao fluconazol e voriconazol.

Boff et al. (2008) em um estudo sobre a sensibilidade do gênero *Candida* à anfotericina B em hospitais do estado do Rio Grande do Sul, encontraram uma variação de CIM de 0,5 a 1,0 $\mu\text{g/ml}$ para isolados de *C. albicans* e *C. não albicans*. No nosso estudo para os isolados de *C. auris* encontramos o valor de CIM de 0,50 $\mu\text{g/ml}$ para os isolados 1 e 3 e o valor de

CIM 0,75 µg/ml para o isolado 2. Boff et al. (2008) ainda discutem que a aplicação da técnica disponibilizada tem gerado interpretações conflitantes, por não ter um ponto de corte definido para classificação como resistente ou sensível, justificando que esta falta de padronização se dá pela utilização do caldo RPMI 1540, que é indicado no documento M27-A2 como obstáculo para detecção de isolados resistentes. Por outro lado, há referência de que CIMs > 1 µg/ml podem ser relacionadas com resistência.

Bidaud et al. (2019), em seu estudo demonstraram que a utilização de anfotericina B, flucitosina, equinocandinas e azólicos podem ser de interesse no tratamento de infecções causadas por *C. auris*. Os autores relatam que a associação de anfotericina B com flucitosina tem ação sinérgica *in vitro* contra outros patógenos fúngicos, como *Cryptococcus neoformans*. Como resultado encontraram quando testados isoladamente os medicamentos nos isolados de *C. auris* a CIM de 0,125 a 1 µg/ml para flucitosina, 0,25 a 1 µg/ml para anfotericina B e 0,03 a 4 µg/ml para voriconazol. Ao fazer a combinação de anfotericina B e flucitosina as faixas de CIM 0,06 a 0,5 µg/ml para anfotericina B e 0,03 a 0,25 µg/ml para flucitosina. Quando realizada a associação de voriconazol com flucitosina os intervalos de CIM diminuíram para 0,008 a 2 µg/ml para voriconazol e 0,008 a 0,5 µg/ml para flucitosina. Desta maneira a flucitosina foi demonstrada como uma boa alternativa para o tratamento da *C. auris*, no entanto, geralmente não é utilizada como monoterapia.

Shastri et al. (2020) estudaram isolados de pacientes de uma unidade de terapia intensiva e realizaram teste de atividade antifúngica, identificando que de 34 isolados 97% foram resistentes ao fluconazol (CIMs de $\geq 32\mu\text{g/ml}$), 93,7% resistentes à anfotericina B (CIMs $\geq 2\mu\text{g/ml}$) e 32,3% resistentes ao voriconazol. Já em relação as equinocandinas apenas 3% foram resistentes à caspofungina e nenhum foi resistente à micafungina.

5.4 Outras classes farmacológicas

A necessidade de busca por medicamentos que possam ser eficazes contra a *C. auris*, impulsionou novas pesquisas.

Moraes e Ferreira-Pereira (2019), fizeram um estudo de revisão para identificar drogas de outras classes farmacêuticas, exploradas como agentes anticandidas e com capacidade de inibir fatores de virulência e apresentar sinergismo com outras substâncias antifúngicas. Esse estudo apresentou medicamentos com uso original como: antidepressivos, antiepilépticos, hipolipemiantes, antiarrítmicos, anti-inflamatórios, antiparasitários, imunossupressores e antitumorais. O estudo faz uma reflexão sobre o cenário epidemiológico das infecções causadas por *Candida*, em especial as cepas resistentes, sobre a possibilidade da estratégia de reposicionamento de drogas. Dentre os medicamentos revisados, foram identificadas a possibilidade de ação no biofilme da *Candida spp*, mas relatam também que a maioria dos estudos não investigaram quais os mecanismos moleculares que são envolvidos na ação antifúngica das drogas, o que demonstra a necessidade de mais estudos.

Billamboz et al. (2021) fizeram uma revisão sobre as possibilidades terapêuticas e discutiram no estudo novas estratégias de desenvolvimento de medicamentos, dada a emergente preocupação com o tema. Entre essas estratégias estão desde o reposicionamento e combinação de drogas, busca por novos compostos, compostos naturais e utilização de metal, complexos de metal e metaloides.

Sobre o reposicionamento de drogas os autores discutem sobre como a aplicação de medicamentos já desenvolvidos podem ajudar, poupando custos com o desenvolvimento de novos medicamentos. Os autores citam um trabalho conduzido por Zagaroza et al. (2019) que identificou 27 drogas que inibiram o crescimento de três cepas diferentes de *C. auris*, que posteriormente tiveram estudos complementares, sendo elas: MK 801 hidrogeno maleato, ciclopirox etanolamina, dicloridrato de trifluoperazina, suloctidil, ebselen citrato de tamoxifeno, rolipram, dimilato de tietilperazina, sulfato de guanadrel e pamoato de pirvinium. No estudo de Billamboz et al. (2021) o reposicionamento da sertralina, medicamento utilizado para depressão, que se mostrou efetiva para inibir a formação de biofilme, com ação envolvido na biossíntese do ergosterol.

Ainda sobre o reposicionamento de drogas, os autores, descrevem estudos sobre validação em *in vivo* de drogas como a miltefosina; a utilização de uma vacina (NDV-3A) testada em camundongos infectados por *C. auris* multirresistente, protegendo os camundongos neutropênicos da infecção. Esta vacina já foi registrada (Ibrahim et al. *apud* Billamboz et al. 2021).

Sobre a utilização de compostos naturais há estudos sobre o uso de farnesol, do shogol (um componente do gengibre), sesquiterpenóides como drimenol e albicanol. A combinação dos monômeros fitoterápicos houttuyfonato de sódio (SH), berberina (BER), plamatina (PAL), jatrorrizina (JAT) e cinamaldeído (CIN) apresentaram boa atividade antifúngica, sendo as combinações mais potentes o cinamaldeído com o houttuyfonato de sódio e a berberina com a plamatina e jatrorrizina (Juanjuan et al. 2020 *apud* Billamboz et al. 2021). Outro estudo realizado por Tran et al. (2020), utilizando óleos essenciais de casca e folha de *Cinnamomum zeylanicum* (conhecida como caneleira-verdadeira), que possui como principais componentes da folha o eugenol e da casca o trans-cinamaldeído, comprovaram atividade antifúngica *in vitro* contra *C. auris*, por danificar a membrana e bloquear a formação de hifas.

Além da busca de novas possibilidades de tratamento, há grande necessidade de novos estudos sobre como limpar e desinfetar adequadamente instrumentos e ambientes.

Considera-se que a atividade antimicrobiana de óleos essenciais depende dos constituintes químicos. Esta atividade pode estar relacionada à presença de compostos da classe dos monoterpenos, fenólicos, fenilpropenos e hidrocarbonetos. Os óleos essenciais de *C. cassia*, *E. caryophyllus*, *O. basilicum* e *T. vulgaris* e os compostos químicos aldeído cinâmico, isoeugenol e timol, utilizados nesta pesquisa, apresentaram as menores concentrações entre os demais óleos essenciais e compostos químicos estudados, sobre *C. auris*, com a vantagem de serem produtos de origem natural, amplamente utilizado na indústria de produtos alimentícios e cosméticos, mencionados anteriormente.

Nesta pesquisa, a anfotericina B apresentou a menor CIM para os três isolados de *C. auris* e resistência aos antifúngicos fluconazol e voriconazol, corroborando com os resultados apresentados por Shaban, Patel e Ahmad (2020) e Szekely et al. (2019).

6. CONCLUSÕES

Nas condições em que foi conduzido o presente estudo, pode-se concluir que:

- ✓ Os óleos essenciais de *Cinnamomum cassia*, *Eucalyptus citriodora*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia caryophyllus*, *Melaleuca alternifolia*, *Ocimum basilicum*, *Origanum Majorana*, *Origanum Vulgare*, *Rosmarinus officinalis*, *Salvia sclarea* e *Thymus vulgaris*, apresentaram atividade fungicida sobre isolados biológicos de *Candida auris*.
- ✓ Os três isolados de *C. auris* foram resistentes aos óleos essenciais *Myristica fragans*, *Schinus terebinthifolius* e *Zingiber officinale*. O isolado 1 também foi resistente ao óleo essencial *Salvia Sclarea*.
- ✓ O óleo essencial *C. cassia* foi o que apresentou a menor concentração fungicida sobre os isolados de *C. auris*.
- ✓ Os compostos químicos Aldeído Cinâmico, Isoeugenol e o Timol apresentaram as menores concentrações fungicidas sobre os isolados de *C.auris*.
- ✓ Os três isolados de *Candida auris* foram resistentes aos compostos químicos α -Cariofileno, β -Cariofileno, γ -Terpineno e ao P-Cimeno.
- ✓ O óleo essencial *C. cassia* e os compostos químicos aldeído cinâmico, isoeugenol e o timol são promissores agentes com atividade anti *Candida auris*.
- ✓ Os três isolados foram resistentes a fluconazol e voriconazol.

✓ A pesquisa apresentou uma possibilidade de tratamento para *C. auris*, sendo promissora a realização de novos estudos para a busca de um tratamento efetivo e seguro contra esse fungo.

REFERÊNCIAS

Abourashed EA, Galal AM, Shebl AM, Jaber SM. Enhancing effect of isoeugenol on the antimicrobial activity of isoniazid, 6-paradol and 6-shogaol. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*. 2008; 13(4): 95-103. doi: 10.1080/10496470801946075

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Comunicado de risco nº 01/2017 – CVIMS/GGTES/ANVISA. Relatos de surtos de *Candida auris* em serviços de saúde da América Latina. Brasília, 2017. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/comunicado-de-risco-no-01-2017-gvims-ggtes-anvisa-1/view>

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alerta de Risco CVIMS/GGTES/Anvisa nº 02/2020. Confirmação de caso de *Candida auris* no Brasil. Brasília. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/alerta-02-2020-candida-auris-09-12-2020.pdf>

Almeida Jr JN, Francisco EC, Hagen F, Brandão IB, Pereira FM, Presta Dias PH, de Miranda MMC, Souza RTJ, Groot T, Colombo AL. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. *J Fungi (Basel)*. 2021 Mar 17;7(3):220. doi: 10.3390/jof7030220.

Almeida Jr JN, Brandoa IB, Francisco EC, Almeida SLR, Dias PO, Pereira FM, Ferreira FS, Andrade TS, Costa MMM, Jordão RTS, Meis JF, Colombo AL. Axillary Digital Thermometers uplifted a multidrug-susceptible *Candida auris* outbreak among COVID-19 patients in Brazil. *Mycoses*. 2021 Jun; 7(10). doi: 10.1111/myc.13320

Amaral F. Técnicas de aplicação de óleos essenciais. São Paulo: Cengage Learning, 2015. ISBN: 978-85-221-2273-8.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Gerencia Geral de Toxicologia – GGTOX. Consulta pública nº 181, de 25 de maio de 2016. Proposta de Resolução para incluir o ingrediente ativo M47- *Melaleuca alternifolia* na Relação de Monografias dos Ingredientes ativos de agrotóxicos, domissanitários e preservantes de madeira. Disponível em <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2779339/CONSULTA+P%C3%9ABLICA+N+181+GGTOX.pdf/9b83b535-5158-4f0d-9d9a-cae2fa5a7005>

Arendrup MC, Prakash A, Meletiadis J, Sharma C, Chowdhary A. Comparison of EUCAST and CLSI Reference Microdilution MICs of Eight Antifungal Compounds for *Candida auris* and Associated Tentative Epidemiological Cutoff Values. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(6):e00485-17. Published 2017 May 24. doi:10.1128/AAC.00485-17

Ashengroph M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Momenbeik F. *Candida galli* Strain PGO6: A Novel Isolated Yeast Strain Capable of Transformation of Isoeugenol into Vanillin and Vanillic Acid. *Current Microbiology.* 2011; 62(3): 990-8. <https://doi.org/10.1007/s00284-010-9815-y>

Auger C, Laurent N, Laurent C, Bensaçon P, Caporiccio P, Teissédre PL, Rouanet JM. Hydroxycinnamic acids do not prevent aortic atherosclerosis in hypercholesterolemic Golden Syrian hamsters. *Life Sciences.* 2004;74(19):2365-77.

Bidaud AL, Botterel F, Chowdhary A, Dannaoui E. *In vitro* antifungal combination of flucytosine with amphotericin B, voriconazole, or micafungin against *Candida auris* shows no antagonism [published online ahead of print, 2019 Oct 7]. *Antimicrob Agents Chemother.* 2019;63(12):e01393-19. doi:10.1128/AAC.01393-19

Billamboz M, Fatima Z, Hameed S, Jawhara S. Promising Drug Candidates and New Strategies for Fighting against the Emerging Superbug *Candida auris*. *Microorganisms.* 2021 Mar 18;9(3):634. doi: 10.3390/microorganisms9030634. PMID: 33803604; PMCID: PMC8003017.

Boff E, Lopes PGM, Spader T, Scheid LA, Loreto É, Dal Forno NF et al. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do estado do Rio Grande do Sul. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. [Internet]. 2008 Feb [cited 2020 Sep 07]; 41(1): 36-40. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0037-86822008000100007&lng=en. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822008000100007>.

Borman AM, Johnson EM. *Candida auris* in the UK: introduction, dissemination and contro. PLoS Pathog. 2020; 16(7):e1008563. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008563> Acesso em 03 out 2020 Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1008563>

Borman AM, Szekely A, Johnson EM. Comparative pathogenicity of United Kingdom isolates of the emerging pathogen *Candida auris* and other key pathogenic *Candida* species. mSphere. 2016;1:pil:e00189-16.

Braga PC, Ricci D. Thymol-induced alterations in *Candida albicans* imaged by atomic force microscopy. Methods Mol Biol. 2011; 736:401-10.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Eucalyptus globulus* Labill. (Eucalipto). Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/21/18-0078-C-M-Eucalyptus-globulus.pdf>

Campos FL, Baroni FA. Isolados de *Cryptococcus neoformans*, *C. gatti* e *C. laurentii* produtores de Protease e Fosfolipase. Rev de Patologia Tropical. 2010;39(2):83–9.

Canela HMS. Perfil fenotípico e genotípico de isolados de *Candida* spp. em episódios de candidemia no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Tese (Doutorado) Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2017. Disponível em: https://teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60135/tde-03072017-071825/publico/Tese_Completa_original.pdf

Casadevall, A, Perfect J R. *Cryptococcus neoformans*. Washington, DC. ASM Press; 1998.

Centers for Disease Control and Prevention. CDC. *Candida auris*. Teste de susceptibilidade antifúngica. Disponível em: <https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>

Centers for Disease Control and Prevention. CDC. Rastreamento *Candida auris*. Disponível em: https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/tracking-c-auris.html?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Ffungal%2Fdiseases%2Fcandidiasis%2Ftracking-c-auris.html

Chaabane F, Graf A, Jequier L, Coste AT. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. *Front Microbiol*. 2019 Nov 29;10:2788. doi: 10.3389/fmicb.2019.02788. PMID: 31849919; PMCID: PMC6896226. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31849919/>

Chakrabarti A, Sood P. On the emergence, spread and resistance of *Candida auris*: host, pathogen and environmental tipping points. *J Med Microbiol*. 2021 Mar;70(3). doi: 10.1099/jmm.0.001318. Epub 2021 Feb 18. PMID: 33599604.

Costa EQ. Nutrição e fitoterapia: tratamento alternativo através das plantas. Coleção Medicina Alternativa. 3ª ed. Petrópolis. Rio de Janeiro: Editora Vozes. 2014

Contieri NB. Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a isolados de *Staphylococcus* spp. e *Pasteurella* spp. oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos. Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Biociência Animal). Faculdade de Zootecnia e Engenharia de

Alimentos. Universidade de São Paulo. 2017. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/74/74135/tde-07122017-145140/publico/ME9206555COR.pdf>

Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. Plos Pathogens. 2020; 16(10): 1-18. doi: 10.1371 / journal.ppat.1008921. eCollection 2020 out. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33091071/>

Duarte MTC. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Multi Ciência: Construindo a história dos produtos naturais: 2006; 1-16.

Esposito E, Azevedo JL (orgs). Fungos: uma introdução à biologia, bioquímica e biotecnologia. 2ª ed. Revisada e ampliada. Caxias do Sul: Educs, 2010. 638p. (Coleção Biotecnologia) ISBN: 978-85-7061-562-6

Falci DR, Pasqualotto AC. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. Clin Biomed Res 2015; 35(2). Doi: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/2357-9730.56021>

Ferreira SB, Dantas TB, Silva DF, Ferreira PB, Melo TR, Lima EO. In Silico and *In Vitro* Investigation of the Antifungal Activity of Isoeugenol against *Penicillium citrinum*. Curr Top Med Chem. 2018; 18(25):2186-96. <https://doi.org/10.2174/1568026619666181130141818>

Figueiredo CSSS, Oliveira PV, Saminez WFS, Diniz RM, Rodrigues JFS, Silva MSM, et al. Óleo essencial da Canela (Cinamaldeído) e suas aplicações biológicas. Rev. Investig, Bioméd. 2017; 9(2): 192-7. DOI: 10.24863/rib.v9i2.143

Freire JM. Óleos essenciais de canela, manjerona e anis-estrelado: caracterização química e atividade biológica sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal de Lavras. 2008.

Gregorí Valdes BS. Estructura y actividad de los antifúngicos. *Revista Cubana de Farmacia*, 2005;39(2), 1. Acesso em 25 de outubro de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75152005000200012&lng=es&tlng=es.

Gruenwald J, Freder J, Armbruester N. Cinnamon and Health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 2010; 50:822–34.

Gucwa K, Milewski S, Dymerski T, Szweda P. Investigation of the Antifungal Activity and Mode of Action of *Thymus vulgaris*, *Citrus limonum*, *Pelargonium graveolens*, *Cinnamomum cassia*, *Ocimum basilicum*, and *Eugenia caryophyllus* Essential Oils. *Molecules*. 2018;23(5):1116. Published 2018 May 8. doi:10.3390/molecules23051116. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29738503/>

Hager CL, Larkin EL, Long L, Zohra Abidi F, Shaw KJ, Ghannoum MA. In Vitro and In Vivo Evaluation of the Antifungal Activity of APX001A/APX001 against *Candida auris*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Feb 23;62(3):e02319-17. doi: 10.1128/AAC.02319-17. PMID: 29311065; PMCID: PMC5826120.

Hata DJ, Humphries R, Lockhart SR; College of American Pathologists Microbiology Committee. *Candida auris*: An Emerging Yeast Pathogen Posing Distinct Challenges for Laboratory Diagnostics, Treatment, and Infection Prevention. *Arch Pathol Lab Med*. 2020 Jan;144(1):107-114. doi: 10.5858/arpa.2018-0508-RA. Epub 2019 Jun 6. PMID: 31169997.

Havkin-Frenkel D, Belanger F. *Biotechnological Production of Vanillin*. In *Biotechnology in Flavor Production* Oxford: Blackwell Publishing Ltd. 2008; 83-98. <https://doi.org/10.1002/9781444302493.ch3>

Ho, C., Li, L., Weng, Y. et al. Eucalyptus essential oils inhibit the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages through reducing MAPK and NF- κ B pathways. *BMC*

Complement Med Ther 20, 200 (2020). <https://doi.org/10.1186/s12906-020-02999-0>

Hou H, Zang X, Zhao L. Effects of *Origanum vulgare* essential oil and its two main components, carvacrol and thymol, on the plant pathogen *Botrytis cinerea*. PeerJ. 2020;8:e9626. Published 2020 Aug 4. Doi:10.7717/peerj.9626

Jakiemiu EAR, Scheer Ap, Oliveira JS, Côcco LC, Yamamoto CI, Deschamps C. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) Study of composition and yield of *Thymus vulgaris* L. oil essential. Semina: Ciências Agrárias, Londrina, v. 31, n. 3, p. 683-688, jul./set. 2010. Disponível em:

<https://www.researchgate.net/publication/269925818> Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho *Thymus vulgaris* L

Karkowska-Kuleta J, Rapala-Kozik M, Kozik A. Fungi pathogenic to humans: molecular base of virulence of *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus*. Acta Biochim Pol. 2009;56(2):211-24.

Kim SH, Iyer KR, Pardeshi L, Muñoz JF, Robbins N, Cuomo CA, Wong KH, Cowen LE. Genetic Analysis of *Candida auris* Implicates Hsp90 in Morphogenesis and Azole Tolerance and Cdr1 in Azole Resistance. mBio. 2019 Jan 29;10(1):e02529-18. doi: 10.1128/mBio.02529-18. Erratum in: mBio. 2019 Mar 19;10(2): PMID: 30696744; PMCID: PMC6355988.

Kumar D, Banerjee T, Pratap CB, Tilak R. Itraconazole-resistant *Candida auris* with phospholipase, proteinase and hemolysin activity from a case of vulvovaginitis. J Infect Dev Ctries. 2015;9:435–7.

Kumar M, Singh A, Kumari S, Kumar P, Wasi M, Mondal AK, Rudramurthy SM, Chakrabarti A, Gaur NA, Gow NAR, Prasad R. Sphingolipidomics of drug resistant *Candida auris* clinical isolates reveal distinct sphingolipid species signatures. Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids. 2021 Jan;1866(1):158815. doi: 10.1016/j.bbalip.2020.158815. Epub 2020 Sep 15. PMID: 32942047; PMCID: PMC7695621.

Larkin E, Hager C, Chandra J, Mukherjee PK. The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation. *37 Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(5):1–13. <https://doi.org/10.1128/AAC.02396-16>

Lepak AJ, Andes DR. 2014. Antifungal pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2015;5:a019653. doi:10.1101/cshperspect.a019653. Acesso em 03 out 2020. Disponível em <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/5/5/a019653.full>

Lima IG, Pereira FO, Oliveira WA, Lima EO, Menezes EA, Cunha FA, Diniz MFFM. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of Essential Oil Research.* 2013;25(2):138-42.

Lima APL, Grosso ESB, Ferreira G, Andrade MC. Efeito antimicrobiano do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes de um hospital escola do Sul de Minas. *Revista Ciências em Saúde.* 2014 (4):2, abr-ju. Doi: <https://doi.org/10.21876/rcsfmit.v4i2.230>

Lima SL, Francisco EC, Almeida Júnior JN, Santos, DWCL, Carlesse F, Queiroz-Telles F, Melo ASA, Colombo AL. Increasing Prevalence of Multidrug-Resistant *Candida haemulonii* Species Complex among All Yeast Cultures Collected by a Reference Laboratory over the Past 11 Years. *J. Fungi.* 2020 (6):110. doi:10.3390/jof6030110.

Luz JMQ, Resende RF, Silva SM, Santana DG, Camilo JS, Blank AF, Haber LL. Produção de óleo essencial de *Ocimum basilicum* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. *Boletim Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 2014: 13(1): 69-80. ISSN 0717 7917. Disponível em: <https://www.redalyc.org/pdf/856/85629766007.pdf>

de Matos SP, Teixeira HF, de Lima ÁAN, Veiga-Junior VF, Koester LS. Essential Oils and Isolated Terpenes in Nanosystems Designed for Topical

Administration: A Review. *Biomolecules*. 2019 Apr 5;9(4):138. doi: 10.3390/biom9040138. PMID: 30959802; PMCID: PMC6523335. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30959802/>

Marinelli L, Fornasari E, Eusepi P, Ciulla M, Genovese S, Epifano F, Fiorito S, Tu. rkez H, Örtücü S, Mingoia M, Simoni, Pugnali A, Stefano AD, Cacciatore I. Carvacrol prodrugs as novel antimicrobial agentes. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 2019; 178: 515-29. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2019.05.093>

Medeiros D, Oliveira-Junior J, Nóbrega J, Cordeiro L, Jardim J, Souza H, et al. Isoeugenol and Hybrid Acetamides against *Candida albicans* Isolated from the Oral Cavity. *Pharmaceuticals (Basel)*. 2020;13(10): 291. doi: 10.3390/ph13100291

Miranda-Cadena K, Dias M, Costa-Barbosa A, Collins T, Marcos-Arias C, Eraso E, Pais C, Quindós G, Sampaio P. Development and characterization of monoolein-based liposomes of carvacrol, cinnamaldehyde, citral or thymol with anti-*Candida* activities. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. AAC. 2021; 01628-20; DOI: 10.1128/AAC.01628-20

Moraes DC, Ferreira-Pereira A. Insights on the anticandidal activity of non-antifungal drugs. *Journal de Mycologie Médicale*. 2019 (29): 253-259. Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523319300551?via%3Dihub#bib0395> <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2019.07.004>

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/clsi/clsi_OPAS1M27-A2.pdf acesso em 24/07/2019

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/servicos/saude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf
Acesso em 07/09/2020

O'Brien B, Chaturvedi S, Chaturvedi V. *In vitro* evaluation of antifungal drug combinations against multidrug-resistant *Candida auris* isolates from New York outbreak. Antimicrob Agents Chemother. 2020; 64(4). Acesso em 03 out 2020. Disponível em: <https://aac.asm.org/content/64/4/e02195-19>

Oliveira LF. Farmacognosia pura [recurso eletrônico]. Porto Alegre: SAGAH, 2018.

O'Meara TR, Robbins N, Cowen LE. The Hsp90 Chaperone Network Modulates *Candida* Virulence Traits. Trends Microbiol. 2017; 25(10): 809-819. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5610082/>

Osei Sekyere J. *Candida auris*: A systematic review and meta-analysis of current updates on an emerging multidrug-resistant pathogen. Microbiologyopen. 2018 Aug;7(4):e00578. doi: 10.1002/mbo3.578. Epub 2018 Jan 18. Erratum in: Microbiologyopen. 2019 Aug;8(8):e00901. PMID: 29345117; PMCID: PMC6079168. Acesso em 05 out 2020. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mbo3.578>

Pacheco SNV, Damasio F. Vanilina: origem, propriedades e produção. Química Nova na Escola. 2010; 32:216.

Pasqualotto AC, Sukiennik TCT, Meis JF. Brazil is so far free from *Candida auris*. Are we missing something? Braz J Infect Dis. 2019 May-Jun;23(3):149-150. doi: 10.1016/j.bjid.2019.05.004. Epub 2019 May 29. PMID: 31152687. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31152687/>

Paula JAM et al . Gênero Pimenta: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. Rev. bras. plantas med., Botucatu , v. 12, n. 3, p.

363-379, Sept. 2010. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722010000300015&lng=en&nrm=iso>. access on 01 Nov. 2020. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722010000300015>.

Pedrosa, FPC. Atividade microbiana de plantas medicinais e aromáticas pertencentes à CPMA – Coleção de Plantas Medicinais e Aromáticas do CPQBA – UNICAMP. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado – Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista. Instituto de Biociências de Botucatu. 2012.

Pegard A. Antimicrobial activity of essential oil of *Bulnesia sarmienti* Lorenz (Gaiac Wood) and of a rectified fraction of this oil. Comparison with *Melaleuca alternifolia* L. (Tea Tree) essential oil activity. *Phytothérapie*. 2015;13(6):384–8. <https://doi.org/10.1007/s10298-015-0966-7>

Pinto, E, Vale-Silva L, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species *Journal of Medical Microbiology* (2009), 58, 1454–1462 <https://doi.org/10.1099/jmm.0.010538-0>

Pinto SML, Sandoval LVH, Vargas LY. In vitro susceptibility of *Microsporium* spp. and mammalian cells to *Eugenia caryophyllus* essential oil, eugenol and semisynthetic derivatives. *Mycoses*. 2019; 62:41-50. doi: 10.1111/myc.12844.

Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Jul;25(7):792-798. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.028. Epub 2019 Apr 6. PMID: 30965100.

Ribeiro DS, Melo DB, Guimarães AG, Velozo ES. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinum officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Semina: Ciências Agrárias*. 2012; 33(2): 687-695. ISSN: 1676-546X. DOI: 10.5433/1679-0359.2012v33n2p687. Disponível em <https://www.redalyc.org/pdf/4457/445744112022.pdf>

Rocha A (org) Fundamentos da Microbiologia. São Paulo: Rideel, 2016. 320 p. ISBN 978-85-339-3744-4

Rhodes J, Fisher MC. Global epidemiology of emerging *Candida auris*. *Curr Opin Microbiol*. 2019 Dec;52:84-89. doi: 10.1016/j.mib.2019.05.008. Epub 2019 Jul 3. PMID: 31279224. Acesso em 05 out 2020. Disponível em <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31279224/>

Rossi, DCP. Estudo terapêutico da gomesina em camundongos com candidíase disseminada e vaginal. Dissertação (Mestrado). Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Acesso em 25 de outubro de 2020. Disponível em: https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-01022010-090841/publico/DiegoConradoPereiraRossi_Mestrado.pdf

Sales GB, Alencar JB, Santos RO, Rodrigues Neto SC, Sousa AP, Oliveira Filho AA. *Origanum majorana* como agente ansiolítico em Odontologia: uma revisão de literatura. *Research, Society and Development*. 2020; (9)5. ISSN 2525-3409. doi: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v9i5.3186>. Disponível em: <https://rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/3186/4782>

Santangelo RT, Nouri-Sorkhabi MH, Sorrell TC, Cagney M, Chen SCA, Kuchel PW & Wright LC Biochemical and functional characterisation of secreted phospholipase activities from *Cryptococcus neoformans* in their naturally occurring state. *J Med Microbiol*. 1999;48:731–40.

Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. *Microbiol Immunol*. 2009;53:41–4.

Sebei K, Sakouhi F, Herchi W, Khouja ML, Boukhchina S. Chemical composition and antibacterial activities of seven *Eucalyptus* species essential oils leaves. *Biol Res*. 2015;48(1):7. Published 2015 Jan 19. doi:10.1186/0717-6287-48-7

Scherer R, Wagner R, Duarte MCT, Godoy HT. Composição e atividades antioxidantes e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. Rev. Bras. Plantas med. Botucatu. 2009;11(4), 442-449. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722009000400013&lng=en&nrm=iso>.

Shaban S, Patel, M. & Ahmad, A. Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris* . Sci Rep 10, 1162 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58203-3>

Shastri OS, Shankarnarayan AS, Oberoi J, Rudramurthy SM, Wattal C, Chakrabarti. *Candida auris* candidemia in na intensive care unit – Porspective observational study to evaluate epidemiology, risk factores, and outcome. Journal of Critical Care. 2020 (57):42-48. <https://doi.org/10.1016/j.jcrc.2020.01.004> Disponível em <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0883944119310615>

Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johnson EM, Richardson MD, Richardson RR. Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. Emerging Infectious Diseases. 2017; 23(2): 328-31.

Singh B, Kaur A, Singh N, Singh JP. Phenolic compounds as beneficial phytochemicals in pomegranate (*Punica granatum* L.) peel: a review. Food Chemistry. 2018; 26:75-86.

Silvestri, JDF, Paroul N, Czyewski E, Lerin L, Rotava I, Cansian RL, Mossi A, Toniazzo G, Oliveira D, Treichel H. (2010). Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres*, 57(5), 589-594. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2010000500004>

Simões CMO (org) et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento [recurso eletrônico]. Porto Alegre: Artmed, 2017. e-PUB. ISBN 978-85-8271-359-4.

Szekely A, Borman AM, Johnson EM. Candida auris Isolates of the Southern Asian and South African Lineages Exhibit Different Phenotypic and Antifungal Susceptibility Profiles In Vitro. J Clin Microbiol. 2019 Apr 26;57(5):e02055-18. doi: 10.1128/JCM.02055-18. PMID: 30867237; PMCID: PMC6498034.

Szweda P, Gucwa K, Kurzyk E, et al. Essential Oils, Silver Nanoparticles and Propolis as Alternative Agents Against Fluconazole Resistant Candida albicans, Candida glabrata and Candida krusei Clinical Isolates. Indian J Microbiol. 2015;55(2):175-183. doi:10.1007/s12088-014-0508-2

Teixeira APC, Nóbrega RO, Lima EO, Araújo WO, Lima IO. Antifungal activity study of the monoterpene thymol against *Cryptococcus neoformans*. Natural Product Research. 2018; 34 (18): 2630-3. DOI: 10.1080/14786419.2018.1547296

Teixeira GF, Garda Buffon J, Baisch ALM, Furlong, EB. Conteúdo de miristicina em preparados de noz moscada (*Myristica fragans*, Houtt). Rev. Inst. Adolfo Lutz (Impr.) [online]. 2008, vol.67, n.1, pp. 39-45. Disponível em: <http://periodicos.ses.sp.bvs.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0073-98552008000100004&lng=es&nrm=iso>. ISSN 0073-9855.

Thomaz DY. Complexo *Candida parapsilosis*: identificação molecular das espécies, análise proteômica dos biofilmes por MALDI-TOF MS e investigação de um surto envolvendo isolados clínicos resistentes aos azólicos. Tese (Doutorado). Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo. 2018. Disponível em: <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5133/tde-13022019-163819/publico/DaniloYamamotoThomazVersaoCorrigida.pdf>

Tran HNH, Graham L, Adukwu EC. In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. Appl Microbiol Biotechnol. 2020 Oct;104(20):8911-8924. doi:

10.1007/s00253-020-10829-z. Epub 2020 Sep 3. PMID: 32880694; PMCID: PMC7502450.

Trombetta, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2005; v.49, n.6, p.2474-2478. Acesso em 25 outubro 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1140516/>

Tsang CSP, Chu FCS, Leung WK, Jin LJ, Samaranayake LP, Siu SC Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *J Med Microbiol*. 2007;56:1393-8.

Tsay S, Kallen A, Jackson BR, Chiller TM, Vallabhaneni S. Approach to the Investigation and Management of Patients With *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast. *Clin Infect Dis*. 2018 Jan 6;66(2):306-311. doi: 10.1093/cid/cix744. PMID: 29020224; PMCID: PMC5798232.

Vieira TR, Barbosa LCA, Maltha CRA, Paula VF, & Nascimento EA. Constituintes químicos de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae). *Química Nova* [online]. 2004;27(4), 536-539. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422004000400004&lng=en&nrm=iso> <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400004>

Vinciguerra V, Rojas F, Tedesco V, Giusiano G, Angiolella L. Chemical characterization and antifungal activity of *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* essential oils and carvacrol against *Malassezia furfur*. *Natural Product Research*. 2018; 33 (22): 3273-7. <https://doi.org/10.1080/14786419.2018.1468325>

Wickes BL. Analysis of a *Candida auris* outbreak provides new insights into an emerging pathogen. *J Clin Microbiol*. 2020 Mar 25;58(4):e02083-19. doi: 10.1128/JCM.02083-19. PMID: 31996439; PMCID: PMC7098746. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31996439/>

Wijesinghe GK, Maia FC, Oliveira TR, *et al.* Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the in-vivo toxicity with *Galleria mellonella* model. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2020;115, e200349. Epub September 25, 2020.<https://doi.org/10.1590/0074-02760200349>

Zhang C, Fan L, Fan S, *et al.* *Cinnamomum cassia* Presl: A Review of Its Traditional Uses, Phytochemistry, Pharmacology and Toxicology. *Molecules.* 2019;24(19):3473. Published 2019 Sep 25. doi:10.3390/molecules24193473

Zhou L, Zhang Z, Wei M, Xie Y, He S, Shi H, Lin Z. Evaluation of the antifungal activity of individual and combined monoterpenes against *Rhizopus stolonifer* and *Absidia coerulea*. *Environ Sci Pollut Res Int.* 2019; 26(8):7804-9. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04278-z>