

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Aline Ludwig

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Candida rugosa*
FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS**

Santa Maria, RS,
2018

Aline Ludwig

**SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Candida rugosa* FRENTE A
ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Farmacologia.**

Orientador: Prof. Dr. Janio Morais Santurio

Santa Maria, RS
2018

Ludwig, Aline
SUSCETIBILIDADE IN VITRO DE Candida rugosa FRENTE A
ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS / Aline Ludwig.- 2018.
64 p.; 30 cm

Orientador: Janio Morais Santurio
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Candida rugosa 2. Diutina rugosa 3.
Suscetibilidade 4. Antifúngicos 5. Óleos essenciais I.
Morais Santurio, Janio II. Título.

Aline Ludwig

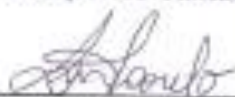
SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Candida rugosa* FRENTE A
ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em Farmacologia da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

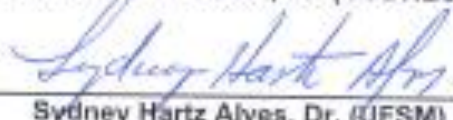
Aprovada em 01 de março de 2018:



Janio Moraes Santurio, Dr. (UFSM)



Érico Silva de Loreto, Dr. (SOBRESP)



Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS

2018

*Dedico este trabalho aos meus pais
e às minhas irmãs.*

AGRADECIMENTOS

Meus sinceros agradecimentos...

À UFSM, por todo o apoio estrutural, profissional e financeiro durante todos os anos de estudo nesta instituição.

À CAPES pela bolsa de estudos.

Ao meu orientador, Prof. Janio Morais Santurio, agradeço pela oportunidade, confiança e paciência comigo. Obrigada pela amizade, pelos momentos de brincadeiras e por todos os ensinamentos.

À Fran Kunz, essa “mãezona” que sempre está disposta a ajudar a todos eu agradeço por tudo que me ensinou e pela ajuda em todo o desenvolvimento deste trabalho, serei eternamente grata.

Ao professor Sydney Hartz Alves, pela amizade, apoio e disponibilidade em me ajudar sempre que solicitei.

À professora Valéria por ter cedido os isolados para realização desta pesquisa.

A todos os colegas com quem convivi nestes quase sete anos de LAPEMI agradeço pelos momentos de aprendizado, amizade e descontração e a toda ajuda recebida. Sentirei falta... principalmente das festinhas!

Às amigas que conquistei no LAPEMI: Carla, Fernanda, Francielli, Julia, Marcela, Maria Isabel e Maiara agradeço pela amizade, pela paciência, pelo apoio e pelos puxões de orelha (que foram essenciais para que esse trabalho fosse finalizado). Obrigada por entenderem meu jeito Aline de ser e mesmo assim continuarem sendo minhas amigas!

Aos meus pais Euclésio e Terezinha e às minhas irmãs Neiva e Adriana, agradeço pelo amor e carinho que sempre tiveram comigo. Obrigada por terem aceitado minhas escolhas e proporcionado os meios para que eu trilhasse meu caminho. Amo vocês!

Ao Eugênio, agradeço pelo amor, carinho, apoio e paciência comigo, principalmente na reta final do mestrado.

Adri e Carlinha, obrigada pelas correções e sugestões no artigo!

À banca de defesa agradeço a disponibilidade em avaliar e contribuir com meu trabalho.

Agradeço também àqueles que não mencionei, mas que de alguma forma se fizeram presentes me ajudando e incentivando nesses dois anos de mestrado. Se há uma coisa que aprendi é que sozinhos não somos nada e nem realizamos nada!

“Amizade é maior que tudo, já diziam os antigos!” (Diego Dias)

Obrigada!

“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se e ver a vida passar.

É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.

Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias frios em casa me esconder.

Prefiro ser feliz embora louco, que em conformidade viver.”

Martin Luther King

Utopia [...]

Ella está en el horizonte —dice Fernando Birri—. Me acerco dos pasos, ella se aleja dos pasos. Camino diez pasos y el horizonte se corre diez pasos más allá. Por mucho que yo camine, nun alcanzaré. ¿Para qué sirve la utopía? Para eso sirve: para caminar.

Fernando Birri citado por Eduardo Galeano, em *Las palabras andantes*.

RESUMO

SUSCETIBILIDADE *IN VITRO* DE *Candida rugosa* FRENTE A ANTIFÚNGICOS E ÓLEOS ESSENCIAIS

AUTORA: Aline Ludwig
ORIENTADOR: Janio Morais Santurio

O isolamento de espécies de *Candida não-albicans* tem aumentado, assim como a resistência dessas leveduras aos antifúngicos existentes. *Candida rugosa* (*Diutina rugosa*) tem sido considerado patógeno emergente e acomete humanos e animais. A avaliação da suscetibilidade aos antifúngicos é uma forma de monitorar a resistência e optar por terapias com melhor resposta. Nesse intuito, o presente estudo, avaliou a sensibilidade de isolados de *C. rugosa* frente aos fármacos fluconazol, voriconazol, cetoconazol, itraconazol, anfotericina B, nistatina, terbinafina, flucitosina, caspofungina, micafungina e anidulafungina. Além disso, como forma de buscar alternativas aos tratamentos convencionais, avaliou-se a atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais obtidos de *Origanum vulgare* (orégano), *Cinnamomum cassia* (canela cassia), *Rosmarinus officinalis* (alecrim), *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Piper nigrum* (pimenta preta) e os compostos carvacol, timol e cinamaldeído frente a *C. rugosa*. Foram utilizadas quinze cepas de *C. rugosa* isoladas a partir de animais (nove cães, três bovinos, um equino, um quati e um gavião). Empregou-se a metodologia de microdiluição em caldo padronizada pelo documento M27- A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), através da qual determinou-se Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos agentes testados. Os resultados demonstraram CIM capaz de inibir 90% das cepas testadas de: 0,125 µg/mL para cetoconazol e voriconazol; 0,25 µg/mL para micafungina; 0,5 µg/mL para anidulafungina; 1 µg/mL para caspofungina; 2 µg/mL para itraconazol, flucitosina e anfotericina B; 8 µg/mL para fluconazol e 16 µg/mL para nistatina. Terbinafina não foi capaz de inibir as cepas de *C. rugosa* testadas. Os compostos majoritários e os óleos essenciais de orégano, canela cassia e manjeriço apresentaram CIM variando de 40 µg/mL a 320 µg/mL. Os óleos de alecrim e pimenta preta, entretanto, não apresentaram atividade inibitória nas concentrações testadas. Em conclusão, o presente trabalho demonstrou o perfil de suscetibilidade de uma pequena coleção de *C. rugosa* isoladas de animais a onze antifúngicos comerciais; ressalta-se, porém a necessidade de estabelecimento de *breakpoints* espécie-específicos para melhor caracterização da suscetibilidade. Mostrou-se também que os óleos de orégano, canela cassia, manjeriço e os compostos carvacol, timol e cinamaldeído apresentam-se como possíveis alternativas de tratamento e merecem avaliação *in vivo* para confirmação de sua atividade frente a infecções por *C. rugosa*.

Palavras chave: *Candida rugosa*. *Diutina rugosa*. Suscetibilidade. Antifúngicos. Óleos essenciais.

ABSTRACT

***IN VITRO* SUSCEPTIBILITY OF *Candida rugosa* AGAINST ANTIFUNGALS AND ESSENTIAL OILS**

AUTHOR: Aline Ludwig

ADVISOR: Janio Morais Santurio

The isolation of *Candida non-albicans* species has increased, as well as the resistance of these yeasts to the existing antifungal. *Candida rugosa* (*Diutina rugosa*) has been considered an emerging pathogen and affects humans and animals. Assessment of antifungal susceptibility is one way of monitoring resistance and predicting appropriate therapies. In this context, the present study evaluated the sensitivity of *C. rugosa* isolates against fluconazole, voriconazole, ketoconazole, itraconazole, amphotericin B, nystatin, terbinafine, flucytosine, caspofungin, micafungin and anidulafungin. In addition, as a way of seeking alternatives to conventional treatments, the *in vitro* antifungal activity of the essential oils obtained from *Origanum vulgare* (oregano), *Cinnamomum cassia* (cassia), *Rosmarinus officinalis* (rosemary), *Ocimum basilicum* (basil), *Piper nigrum* (black pepper) and the compounds carvacrol, thimol and cinnamaldehyde against *C. rugosa*. Fifteen *C. rugosa* strains isolated from animals (nine dogs, three cows, one equine, one coati, one hawk) were used. The broth microdilution methodology standardized by Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) document M27-A3 was used to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of the tested agents. The results showed MIC capable of inhibiting 90% of the tested strains of: 0.125 µg/mL for ketoconazole and voriconazole; 0.25 µg/mL for micafungin; 0.5 µg/mL for anidulafungin; 1 µg/mL for caspofungin; 2 µg/mL for itraconazole, flucytosine and amphotericin B; 8 µg/mL for fluconazole and 16 µg/mL for nystatin. Terbinafine was not able to inhibit the yeast growth. The compounds carvacrol, thimol and cinnamaldehyde and the essential oils of oregano, cassia and basil presented MIC ranged from 40 µg/mL to 320 µg/mL. Moreover, the essential oils of black pepper and rosemary were tested but did not present activity in the concentration used. In conclusion, the present work demonstrated the susceptibility profile of a small collection of *C. rugosa* isolated from animals to eleven commercial antifungals; however, it is necessary to establish species-specific breakpoints to better characterize the susceptibility. It was also shown that the oils of oregano, cinnamon cassia, basil and the compounds carvacrol, thymol and cinnamaldehyde are possible alternatives of treatment and deserve *in vivo* evaluation to confirm their activity against *C. rugosa* infections.

Key words: *Candida rugosa*. *Diutina rugosa*. Susceptibility. Antifungals. Essential oils.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1 – Estrutura química dos agentes antifúngicos azólicos.	16
Figura 2 – Estrutura química anfotericina B e nistatina.	17
Figura 3 – Estrutura química da flucitosina.	18
Figura 4 – Estrutura química das equinocandinas.	19
Figura 5 – Estrutura química da terbinafina.	20
Figura 6 – Estrutura química do carvacrol e do timol.	24
Figura 7 – Estrutura química do cinamaldeído	25

LISTA DE TABELAS

MANUSCRITO

Tabela 1 – Identification and origin of the strains.	47
Tabela 2 – Susceptibility of <i>C. rugosa</i> against antifungals agents.	49
Tabela 3 – Susceptibility ($\mu\text{g/mL}$) of <i>C. rugosa</i> against essential oils.	50

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
1.2 PROPOSIÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1 AGENTES ANTIFÚNGICOS	16
2.1.1 Azólicos.....	16
2.1.2 Poliênicos	17
2.1.3 Análogos da pirimidina.....	18
2.1.4 Equinocandinas.....	19
2.1.5 Alilaminas	19
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	20
2.2.1 <i>Origanum vulgare</i>	21
2.2.2 <i>Cinnamomum cassia</i>	22
2.2.3 <i>Ocimum basilicum</i>	22
2.2.4. <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
2.2.5 <i>Piper nigrum</i>	24
2.2.6 Carvacrol e Timol	24
2.2.7 Cinamaldeído	25
2.3 GÊNERO <i>Candida</i>	26
2.4 INFECÇÕES POR <i>Candida</i> spp.....	27
2.5 <i>Candida rugosa</i>	28
2.6 Suscetibilidade de <i>Candida rugosa</i>	31
3 MANUSCRITO	35
4 CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	54

ESTRUTURA E ORGANIZAÇÃO

Os materiais e métodos, resultados e discussão que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo e encontram-se na seção MANUSCRITO, assim como as referências bibliográficas citadas no artigo. As referências encontradas no final deste trabalho referem-se às citações contidas nos itens APRESENTAÇÃO e REVISÃO DA LITERATURA.

1 APRESENTAÇÃO

Leveduras do gênero *Candida* são componentes da microbiota de humanos e animais. Entretanto, devido a falhas de proteções física, química e imunológica, esses micro-organismos podem tornar-se patogênicos e causar enfermidades, que são denominadas candidoses (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2004; SIDRIM & ROCHA, 2004).

Um aumento das infecções causadas por *Candida* spp. tem sido descrito nas últimas décadas, especialmente após o advento da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), além disso, o uso indiscriminado de antibióticos e imunossupressores estão envolvidos nos casos mais graves da doença (WINGETER et al., 2007). Nos animais, assim como nos humanos, a propagação das leveduras é facilitada por fatores como: estresse, alterações do pH, uso de antibióticos, glicocorticoides ou fármacos indutores de neutropenia, deficiência nutricional, doenças metabólicas e endocrinopatias (CLEFF et al., 2007).

Mais de 200 espécies fazem parte do gênero *Candida* e embora *Candida albicans* continue sendo a mais comum associada às candidoses, o isolamento de espécies não-*albicans* tem aumentado (PFALLER & DIEKEMA, 2007; MANZANO-GAYOSSO et al., 2008). Diversos estudos relatam o isolamento de *Candida rugosa* a partir de infecções tanto em pacientes animais quanto em humanos. Este patógeno tem sido considerado agente emergente de infecções, sendo proeminente na América Latina (PFALLER et al., 2006). Em humanos, *C. rugosa* muitas vezes está associada a indivíduos imunocomprometidos submetidos a procedimentos médicos invasivos (COLOMBO et al., 2003; MINCES et al., 2009). Há relatos na literatura de insucesso terapêutico e resistência *in vitro* de *C. rugosa* aos antifúngicos (DUBE et al., 1994; COLOMBO et al., 2003; HERNANDEZ et al., 2004; PFALLER et al., 2010.)

O arsenal de medicamentos antifúngicos existentes é limitado e há relatos de diferentes espécies de *Candida* resistentes a esses fármacos. A resistência aos antifúngicos tem sido monitorada em cepas de *Candida* sp. isoladas a partir de infecções em humanos (LOEFFLER et al., 2000). Apesar da metodologia para testes de suscetibilidade estar estabelecida e padronizada pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), são pouco frequentes os trabalhos que avaliam a sensibilidade *in vitro* de cepas de *Candida* sp. isoladas de animais.

Em virtude da escassez de informações sobre o perfil de sensibilidade de cepas de *C. rugosa*, principalmente oriundas de animais, a drogas antifúngicas e levando-se em consideração o potencial patogênico do gênero *Candida*, estudos de avaliação de suscetibilidade *in vitro* são fundamentais para escolha do tratamento adequado da infecção por *C. rugosa*.

Além disso, é pertinente a busca de novas opções terapêuticas para as infecções fúngicas e, dentre as alternativas que podem ser exploradas, encontram-se os óleos essenciais. Segundo Craveiro et al. (1981) a designação “óleo essencial” caracteriza líquidos oleosos voláteis dotados de aroma forte, extraídos de plantas por alguns processos específicos, sendo o mais frequente a destilação por arraste de vapor de água. Estes compostos são metabólitos secundários das plantas que tem por função defesa contra ataques por micro-organismos e herbívoros, além de atraírem insetos visando à polinização (COWAN, 1999).

Os óleos essenciais vêm sendo usados com diversas finalidades durante muitos séculos; nas últimas décadas, numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados avaliando as atividades antibacterianas e antifúngicas destas substâncias (COSENTINO et al., 1999; PINA-VAZ et al., 2004; TAMPIERI et al., 2005; KHAN et al., 2011; EBANI et al., 2017; KSOURI et al., 2017). Componentes como terpenos, alcaloides, flavonoides presentes nos óleos essenciais de plantas são possivelmente responsáveis pelas propriedades terapêuticas dos óleos (PICCINELLI et al., 2014; COSTA et al., 2015). Nesse contexto, ressalta-se a importância de avaliar a atividade antifúngica de óleos essenciais obtidos de plantas frente a fungos patogênicos, especialmente devido à resistência que vem sendo observada em espécies de *Candida não-albicans*

1.2 PROPOSIÇÃO

Avaliar a suscetibilidade *in vitro* de isolados de *Candida rugosa* frente a antifúngicos, óleos essenciais e componentes majoritários.

- Analisar, com base nas concentrações inibitórias mínimas (CIM), a suscetibilidade de *C. rugosa* frente aos agentes voriconazol, cetoconazol, itraconazol, fluconazol, caspofungina, micafungina, anidulafungina, nistatina, anfotericina B, terbinafina e flucitosina;
- Investigar, com base nas CIMs, a suscetibilidade de *C. rugosa* frente aos óleos essenciais de orégano, canela cássia, manjeriço, alecrim, pimenta preta e aos compostos majoritários carvacrol, timol e cinamaldeído.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 AGENTES ANTIFÚNGICOS

Fungos e mamíferos são seres eucariotos e por esse motivo suas células apresentam muitas semelhanças. Esse fator traz limitações ao desenvolvimento de fármacos, muitas substâncias com propriedades antifúngicas causam reações deletérias inespecíficas, podendo acarretar uma série de efeitos colaterais à terapia (LACAZ et al., 2002; SIDRIM & ROCHA, 2004).

As classes de agentes com propriedades antifúngicas que estão disponíveis no mercado são derivados poliênicos (anfotericina B e nistatina), azólicos (cetoconazol, miconazol, itraconazol, fluconazol, voriconazol, ravuconazol, posaconazol, isavuconazol), alilaminas (terbinafina e naftifina), antimetabólitos (5-flucitosina) e inibidores da síntese de glucana (caspofungina, anidulafungina e micafungina) (DERESINSKI & STEVENS, 2003; JOHNSON et al., 2004; MICELI & KAUFFMAN, 2015).

2.1.1 Azólicos

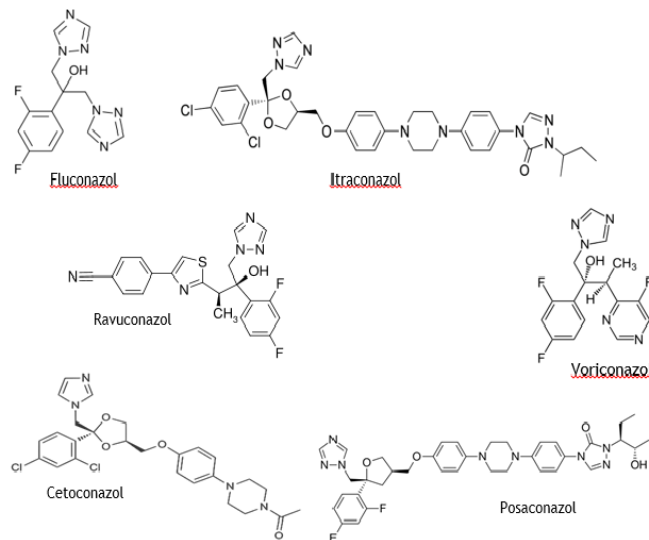
Os antifúngicos azólicos constituem-se de um grupo de fármacos sintéticos fungistáticos (Figura 1), caracterizados por apresentarem um anel imidazólico ligado por ligação carbono-nitrogênio com outros anéis aromáticos (SPINOSA et al., 2002). O número de átomos de nitrogênio presentes no anel imidazol determina a classificação desses fármacos em imidazólicos (miconazol, cetoconazol) quando houver dois átomos de nitrogênio e triazólicos (fluconazol, itraconazol, voriconazol, posaconazol, ravuconazol) quando apresentarem três átomos de nitrogênio (CATTALÁN & MONTEJO, 2006).

A atividade antifúngica dos azólicos ocorre através de diversos mecanismos, sendo o mais importante a inibição da síntese do ergosterol, um importante componente da membrana plasmática dos fungos. Esses agentes ligam-se a a enzima 14- α -demetilase presente no citocromo P450 da célula fúngica e inibem a desmetilação do lanosterol, um precursor do ergosterol (SPINOSA et al., 2002). A inibição da produção do ergosterol ocasiona mudanças na estrutura e funções da

membrana celular, levando a inibição do crescimento fúngico (KANAFANI & PERFECT, 2008).

Os triazólicos apresentam elevado espectro de atividade e baixa toxicidade, pois possuem alta afinidade com citocromo P450 dos fungos e não tem afinidade pelo citocromo P450 dos mamíferos (SPINOSA et al., 2002).

Figura 1- Estrutura química dos agentes antifúngicos azólicos.



2.1.2 Poliênicos

No início da década de 1950, surgiram os derivados poliênicos, representados pela anfotericina B e ninstatina (SIDRIM & ROCHA, 2004). A Anfotericina B foi, até os anos 1990, o fármaco mais utilizado no tratamento de micoses sistêmicas (MAERTENS, 2004). A nistatina, devido a sua toxicidade, é usada na sua forma tópica (BEN-AMI et al., 2008).

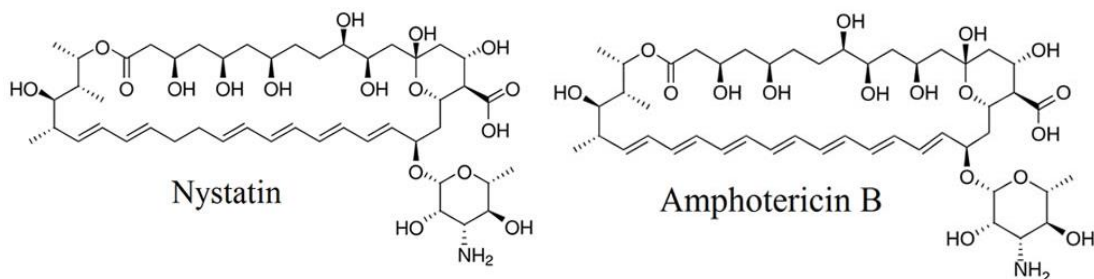
Os poliênicos são fungicidas de amplo espectro, produzidos por bactérias do gênero *Streptomyces* e caracterizados por terem porções hidrofílicas e hidrofóbicas em suas moléculas (Figura 2). Seu mecanismo de ação está baseado em alteração da permeabilidade da membrana celular, pois ligam-se ao ergosterol presente na membrana da célula fúngica formando pequenos canais transmembranares. Com isso, ocorre extravasamento de componentes citoplasmáticos vitais e ocorre morte da célula (GOODMAN & GILMAN, 2003; CATTALÁN & MONTEJO, 2006).

A anfotericina B necessita ser administrada nas formas intravenosa,

intratecal ou inalatória, pois não é absorvida por via oral ou intramuscular (GUBBINS & ANAISSIE, 2002). É insolúvel em água, necessitando solubilização em meio contendo deoxicolato. Essa forma permite que a anfotericina B se ligue ao colesterol das células de mamíferos, provocando vários efeitos adversos, entre eles a nefrotoxicidade (BRANCH, 1988).

Atualmente, existem formas de apresentação da anfotericina B desenvolvidas pela indústria para limitar sua toxicidade: anfotericina B complexo lipídico, anfotericina B em dispersão coloidal e a forma lipossomal. Estas formulações apresentam bom espectro de ação e são menos nefrotóxicas (REX et al., 2001; DUPONT, 2002).

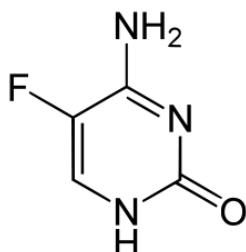
Figura 2: Estrutura química anfotericina B e nistatina



2.1.3 Análogos da pirimidina

Também na metade do século XX foi descoberta atividade antimicótica da flucitosina, um derivado pirimidínico fluorado (Figura 3), que ampliou o arsenal terapêutico das micoses profundas (SIDRIM & ROCHA, 2004). A flucitosina é um pró-fármaco sintético do tipo antimetabólito. Sua ação ocorre através da conversão, no citoplasma da célula fúngica, em 5-fluoracil, que é convertido em 5-fluoro-2'-deoksiuridina 5'-monofosfato, um antimetabólito que inibe a enzima timidilato sintetase, com isso inibindo a síntese do DNA fúngico (SPINOSA et al., 2002).

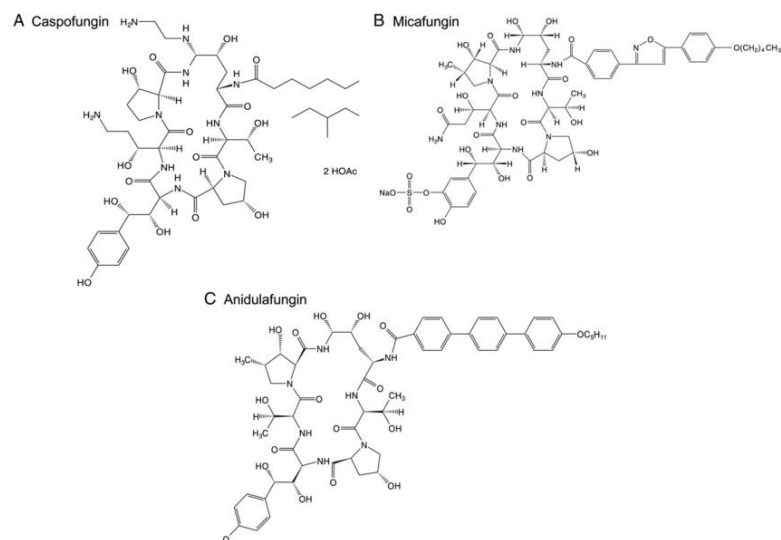
Figura 3: Estrutura química da flucitosina.



2.1.4 Equinocandinas

As equinocandinas são lipopeptídeos semissintéticos que tem como alvo a parede celular do fungo, inibindo a enzima β -1-3-glucana sintase, ligada a síntese de β -1-3-D-glucana, componente da parede celular dos fungos (DERESINSKI & STEVENS, 2003). Essa é a classe mais nova de antifúngicos, composta por caspofungina, anidulafungina e micafungina (Figura 4), que são derivados de produtos naturais de fermentação fúngica (GUBBINS & ANAISSIE, 2002). A toxicidade deste grupo é baixa devido à ausência da molécula de glucana nas células dos mamíferos (ARIKAN et al., 2005).

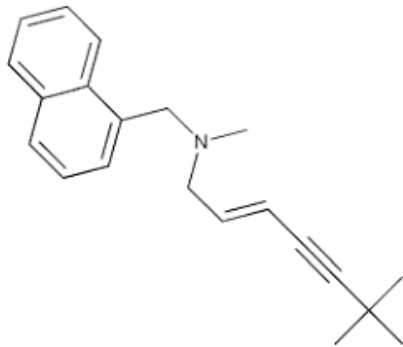
Figura 4: Estrutura química das equinocandinas.



2.1.5 Alilaminas

A terbinafina (Figura 5) é um antifúngico químico, do grupo das alilaminas, que inibe a ação da esqualeno epoxidase, enzima importante para a formação do ergosterol na membrana fúngica, resultando em morte celular (ODDS et al., 2003). Os efeitos tóxicos são limitados e temporários e os sinais mais frequentes estão relacionados ao trato gastrointestinal ou tecido cutâneo (RICHARDSON & WARNOCK, 1993).

Figura 5: Estrutura química da terbinafina.



2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

A utilização de plantas na cura e prevenção de doenças, principalmente por curandeiros e benzedeadas, é uma prática comum desde os primórdios da civilização humana. O uso dessas plantas de forma empírica acaba servindo como triagem para que pesquisas científicas sejam realizadas e as propriedades terapêuticas elucidadas (ALMEIDA, 2003).

Óleos essenciais são originados do metabolismo secundário de plantas. Numerosos estudos *in vitro* e *in vivo* foram realizados nas últimas décadas avaliando atividades antibacterianas e antifúngicas de óleos essenciais. Hoje em dia, possuem muitas aplicações na indústria de alimentos, cosméticos, agrônômica e farmacêutica (DEANS et al., 1989; GONÇALVES et al., 2003; BURT, 2004, TAMPIERI et al., 2005).

A composição química desses óleos é complexa, formada por hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples, fenóis, aldeídos, éteres, ácidos orgânicos, ésteres, cetonas, lactonas, cumarinas, compostos contendo nitrogênio e enxofre (GONÇALVES et al., 2003). Esses compostos apresentam-se em diferentes concentrações nos óleos essenciais e normalmente um deles é o majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades, sendo denominados de elementos traços (SIMÕES et al., 1999).

Estudos demonstram que os compostos majoritários, isoladamente, eventualmente apresentam maior atividade inibitória quando comparados ao óleo essencial originário, uma possível explicação pode ser o fato de que compostos encontrados em menor concentração exerçam efeito antagonista na atividade do óleo (BASSOLE et al., 2003; BOTELHO et al., 2007).

A capacidade antimicrobiana de óleos essenciais é amplamente conhecida e comprovada, todavia os mecanismos pelos quais esses óleos atuam não estão completamente elucidados (LAMBERT et al., 2001). Devido ao variado número de compostos químicos presentes nos óleos essenciais, é provável que sua atividade não seja atribuível a um mecanismo específico, mas que existam vários alvos na célula (CARSON et al., 2002).

Existe consenso de que grande parte dos compostos aromáticos e fenólicos atue na membrana plasmática dos micro-organismos, modificando sua estrutura e função (HOLLEY & PATEL, 2005). Alguns mecanismos comumente aceitos como responsáveis pela ação antimicrobiana são: dano à membrana citoplasmática, degradação da parede celular, danos às proteínas da membrana, perda dos componentes celulares, coagulação do citoplasma e diminuição do fluxo de prótons através da membrana celular (BURT, 2004).

2.2.1 *Origanum vulgare*

O óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) é rico em carvacrol, timol e terpenol. O orégano atua como tônico geral, digestivo, espasmolítico, expectorante, antisséptico, analgésico e cicatrizante (CÁCERES, 1999).

Há evidências de que óleo essencial de orégano apresente atividade contra bactérias e fungos (SIVROPOULOU et al., 1996; ALIGIANNIS et al., 2001; ELGAYYAR et al., 2001). Manohar et al. (2001) demonstraram que o óleo essencial de orégano possui efeito fungicida contra *C. albicans*, além de inibir a formação de tubo germinativo desta levedura. Neste estudo, as propriedades antifúngicas do óleo de orégano foram examinadas *in vitro* e *in vivo* frente a *C. albicans*. A combinação do uso de óleo de orégano com nistatina foi avaliada por Rosato et al. (2009) e apresentou efeito sinérgico.

Em estudo realizado por Pozzatti e colaboradores (2009) sobre a atividade de óleos essenciais, o óleo de orégano demonstrou efeito antifúngico frente a cepas de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Em outro estudo, os autores mostraram capacidade do óleo essencial de orégano em inibir a formação de tubo germinativo em isolados de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. Destaca-se a importância desse resultado, pois a

produção de tubo germinativo é um mecanismo importante na patogenicidade destas espécies (POZZATTI et al., 2010).

Óleo essencial de *O. vulgare* mostrou-se efetivo frente a cepas de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei* e *C. glabrata* sensíveis e resistentes e resistentes ao fluconazol (POZZATTI et al., 2008). Nas pesquisas de Abrantes et al. (2013) o óleo também apresentou efeito inibitório sob *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*.

2.2.2 *Cinnamomum cassia*

O óleo essencial de canela, bem como a canela em pó, são empregados na preparação de alguns medicamentos na área farmacêutica. Esta planta apresenta propriedades estomáquica, carminativa e emenagoga (SOUZA et al., 1991). Seu óleo essencial é rico em cinamaldeído, acompanhado do ácido cinâmico, eugenol e linalol (LORENZI & MATOS, 2002).

Um estudo realizado por Giordani et al. (2006) avaliou a atividade antifúngica do óleo de *C. cassia* e também sua atividade combinada à anfotericina B. O óleo essencial exibiu potente atividade frente a *C. albicans* e potencializou o efeito da anfotericina B (GIORDANI et al., 2006).

Atividade inibitória do óleo essencial de *C. cassia* foi evidenciada frente a bactérias, leveduras e fungos filamentosos (OOI et al., 2006) O óleo também foi testado frente a *C. albicans*, apresentando atividade inibitória e anti-biofilme (DE ALMEIDA et al., 2016).

2.2.3 *Ocimum basilicum*

O manjeriço (*O. basilicum*) é uma planta odorífera comumente utilizado na culinária e na medicina popular. Possui ação antiespasmódica, antitérmica e digestiva, além de ser efetivo contra algumas infecções bacterianas e parasitárias. Seu óleo essencial é composto geralmente por timol, metil-chavicol, linalol, eugenol e cineol (LORENZI & MATOS, 2002).

O óleo essencial de *O. basilicum*, na concentração de 500 partes por milhão (ppm), inibiu completamente *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. ochraceus* e

Fusarium moniliforme (SOLIMAN & BADEAA, 2002). Estudos tem relacionado a alta concentração de linalol, um monoterpene, com a atividade antimicrobiana do manjeriço (HANIF et al., 2011).

O óleo essencial de manjeriço exibiu acentuada atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Candida albicans*, *S. pneumoniae* e *Aspergillus niger*. (HANIF et al., 2011). A atividade antimicrobiana desse óleo também foi testada contra isolados clínicos dos gêneros *Staphylococcus*, *Enterococcus* e *Pseudomonas*, demonstrando CIMs entre 0,003% e 0,0007% (v/v) (OPALCHENOVA & OBRESHKOVA, 2003).

2.2.4. *Rosmarinus officinalis*

O alecrim (*R. officinalis*) é utilizado popularmente no tratamento de amigdalites, anemias, bronquite, cefaléia, cólica, indigestão, náusea, entre outros (CÁCERES, 1999).

Mangena & Muyima (1999) pesquisaram a ação antimicrobiana de três plantas, incluindo o alecrim, através da técnica de difusão em ágar e observaram que várias espécies de bactérias foram sensíveis ao óleo. Em um estudo realizado por Correa-Royero et al. (2010), a concentração de 500 µg/mL do óleo essencial de alecrim inibiu o crescimento *in vitro* de *Candida krusei*.

Ebani et al. (2017) também documentaram atividade *in vitro* do óleo essencial de alecrim frente a bactérias e fungos, incluindo espécies de *Candida*. Os isolados testados nesse estudo eram provenientes de cães e gatos com otite externa, mostrando que esse óleo pode servir como alternativa no tratamento dessa doença em pequenos animais. Outro estudo mostrou que esse óleo tem potencial inibitório frente a cepas de *Candida* isoladas de vacas com mastite (KSOURI et al., 2017).

Achados diferentes foram encontrados em estudos de Pozzatti et al. (2009), em que o óleo essencial de *R. officinalis* não foi capaz de inibir *C. albicans* e *C. dubliniensis*, na concentração máxima de 3200µg/mL.

2.2.5 *Piper nigrum*

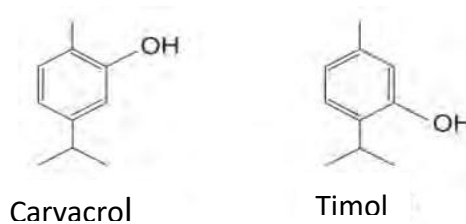
Piper nigrum, conhecida como pimenta preta ou pimenta do reino, é utilizada como condimento e quando aplicada topicamente produz efeito rubefaciente, estimulante e desinfetante. A composição química do óleo inclui, entre outros, limoneno, sabineno, β -cariofileno, β -pineno (MARTINS et al., 1998).

Testes realizados por NIKOLIĆ et al. (2017) demonstraram efeito antibacteriano e antifúngico do óleo essencial de *P. nigrum*. Nesse mesmo estudo o óleo apresentou efeito sinérgico ao ser combinado com *Melaleuca alternifolia* e *Citrus limon*.

2.2.6 Carvacrol e Timol

Timol e carvacrol (Figura 6), isômeros de posição, são fenóis monoterpênóides biosintetizados a partir do γ -terpineno e p-cimeno, encontrados em diversas plantas aromáticas (BASER & DEMIRCI, 2007). São creditados a esses compostos uma série de propriedades farmacológicas, entre elas atividade antifúngica e antibacteriana (DORMAN & DEANS, 2000; LAMBERT et al., 2001; PINA-VAZ et al., 2004; CHAMI et al., 2005; BRAGA et al., 2007; GUO et al., 2009).

Figura 6 – Estrutura química do carvacrol e do timol.



O timol é encontrado no óleo essencial de alguns membros do gênero *Thymus* e *Origanum*, da família Lamiaceae, como *T. vulgaris* (tomilho) e *O. vulgare* (orégano) (HUDAIB et al., 2002). O carvacrol também encontrado no óleo essencial de orégano (*O. vulgare*) (TIAN & LAI, 2006) bem como de outras espécies do

mesmo gênero, como *O. minutiflorum* (SARER et al., 1996) e *O. onites* (VOKOU et al., 1988),

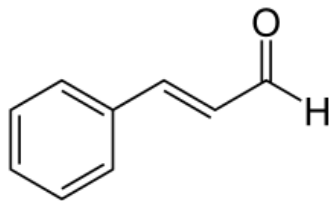
Os compostos fenólicos são capazes de dissolverem-se na membrana microbiana, e, desta forma, penetrarem dentro da célula onde podem interagir com mecanismos essenciais para o metabolismo microbiano (MARINO et al., 2001). Acredita-se, que o potencial antimicrobiano de compostos fenólicos, como carvacrol e timol, apresente-se intimamente relacionado à presença de um grupo hidroxila no anel fenólico, particularidade que lhes conferem um alto poder reativo (ULTEE et al., 2002).

Um estudo realizado por Ahmad, Khan et al. (2011) avaliou a atividade antifúngica dos compostos carvacrol e timol frente a cepas de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, sensíveis e resistentes ao fluconazol e a anfotericina B, demonstrando CIM variando entre 75 µg/mL e 100 µg/mL para carvacrol e de 100 µg/mL a 150 µg/mL para o timol. A ação desses compostos lipofílicos ocorre devido a interação com a membrana, formando poros e bloqueio da biossíntese do ergosterol. Os compostos demonstraram atividade fungicida dose dependente e nível de citotoxicidade insignificante, mostrando serem promissores antifúngicos.

2.2.7 Cinamaldeído

O cinamaldeído é o principal constituinte do óleo essencial da casca de canela e outras plantas do gênero *Cinnamomum*, da família Lauraceae (ALBUQUERQUE, 1989). O cinamaldeído (Figura 7) apresenta várias atividades como, por exemplo, antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (SINGH et al., 2007).

Figura 7 – Estrutura química do cinamaldeído.



Segundo estudos de Kim et al. (2012), o trans-cinamaldeído aumentou a atividade antifúngica *in vitro* da anfotericina B frente a *Candida* spp. e *Cryptococcus*

neoformans. O trans-cinamaldeído provoca perturbações na homeostase do sistema antioxidante do fungo, aumentando a atividade antifúngica da anfotericina B (KIM et al., 2012). Sinergismo *in vitro* também foi observado na associação de cinamaldeído e fluconazol frente a *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum* (KHAN & AHMAD, 2011).

Shreaz et al. (2011) avaliaram o potencial antifúngico de cinamaldeído frente a espécies de *Candida* fluconazol resistentes e as CIM variaram de 100 µg/mL a 500 µg/mL. Os autores verificaram, através dos métodos de disco-difusão e curva de morte que o composto possui atividade fungicida. Este estudo ressalta que o cinamaldeído, além de inibir a biossíntese do ergosterol, inibe a bomba de prótons presente na membrana plasmática dos fungos, levando a uma acidificação e consequente morte da célula. Em comparação ao fluconazol, o cinamaldeído mostrou níveis muito baixos de toxicidade

2.3 GÊNERO *Candida*

Infecções por *Candida* têm sido observadas desde os tempos de Hipócrates, nos anos 400 antes de Cristo, que descreveu a doença em pacientes debilitados (SERRACARBASSA & DOTTO, 2003). Ao longo do tempo, essa levedura recebeu várias nomeações e em 1923 foi classificada no gênero *Candida* por Berkhout (ODDS, 1998). Atualmente, o gênero *Candida* pertence ao filo Ascomycota, classe Hemiascomycetes, ordem Saccharomycetales e família Candidaceae (fase anamórfica de Saccharomycetales) (WEBSTER & WEBER, 2007).

Já foram descritas cerca de 200 espécies do gênero, mas poucas são as espécies que causam infecções (PFALEER & DIEKEMA, 2004; RIBEIRO, 2008). Estas leveduras estão distribuídas de forma ubíqua na natureza e estão presentes na microbiota normal de homens e animais, sendo consideradas como micro-organismos oportunistas (LACAZ, 2002; SUZUKI, 2009; BARBEDO & SGARBI, 2010). Desequilíbrios entre os mecanismos de defesa dos hospedeiros e os fatores de virulência desses micro-organismos podem levar a ocorrência de infecção (DIGNANI et al., 2003).

Os relatos de infecções causadas por outras espécies de *Candida*, além de *C. albicans*, tem aumentado nos últimos anos. Destaca-se que os avanços e melhorias nas técnicas de identificação de leveduras podem estar relacionados com esse

aumento. Vários autores sugerem, também, que este fenômeno seja decorrente da combinação de diferentes variáveis, incluindo pressão seletiva de antifúngicos, aumento de pacientes portadores de diferentes doenças degenerativas e neoplasias e a maior utilização de procedimentos invasivos (COLOMBO et al., 1999; NUCCI & MARR, 2005; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Os fungos do gênero *Candida* apresentam uma estrutura unicelular ovalada, gram-positiva com tamanho variável de 2 a 6 µm. As colônias têm coloração que varia de branca a amarelada, superfície lisa ou levemente rugosa e textura glabrosa úmida (MORETTI et al., 2004), que crescem bem dentro de 48 horas, entre temperaturas de 25 e 37°C (SIDRIM & ROCHA, 2004).

Em geral reproduzem-se de forma assexuada por brotamento ou fissão formando unidades denominadas blastoconídios, os quais em algumas espécies são alongados e não se separam, sendo conhecidos como pseudo-hifas. Estas estruturas contribuem com a capacidade de invasão tecidual e conseqüentemente com a patogenicidade da levedura (RIPPON, 1988).

2.4 INFECÇÕES POR *Candida* spp.

As infecções causadas por leveduras do gênero *Candida* são denominadas candidíases ou candidoses (LACAZ et al., 2002) e essas infecções podem apresentar manifestações clínicas variadas, atingindo membranas mucosas, pele e também podendo ocorrer na forma sistêmica, como sepse, endocardite e meningite (FLEVARI et al., 2013).

Alguns fatores de risco são importantes para a mudança de *status* do fungo de comensal para patogênico, como doenças degenerativas, neoplásicas, imunodeficiências congênita ou adquirida (COLOMBO et al., 2006; PFALLER & DIEKEMA, 2007). Outros fatores que também contribuem para a infecção por *Candida* são o rompimento de barreiras mucocutâneas, disfunção dos neutrófilos, desordem metabólica, procedimentos cirúrgicos, uso de cateteres, antibioticoterapia e corticoterapia prolongada, transplantes e quimioterapia (BALKIS et al., 2002; TRICK et al., 2002; COLOMBO et al., 2006; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2007; PFALLER & DIEKEMA, 2007).

Outro ponto importante para o estabelecimento das candidoses é a expressão de fatores de virulência pelo fungo, como aderência aos tecidos e formação de

biofilmes, produção de enzimas líticas que atuam na destruição de membranas celulares e pleomorfismo (TEN CATE et al., 2009; SOUZA et al., 2010).

Infecções por *Candida* spp. em animais são pouco frequentes. No entanto, nos últimos anos, tem sido observado um aumento considerável de relatos de infecções por essas leveduras (DUARTE et al., 2001). Em animais domésticos, essas leveduras costumam afetar o conduto auditivo, sistema digestório, genitourinário, tegumentar, meninges, coração e fígado. Nas aves *Candida* spp. pode causar lesões no sistema digestório, desenvolvendo uma doença popularmente conhecida como papo pendular (CRUZ, 2010). Mastite, um dos principais problemas da bovinocultura de leite, também pode ser causada por espécies de *Candida* (SANTOS & MARIN, 2005).

Infecções sistêmicas por *Candida* spp. são relatadas rotineiramente em hospitais humanos, sendo caracterizadas por alta morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes imunocomprometidos. Contudo, na medicina veterinária, as infecções sistêmicas são relatadas de forma isolada, especialmente em pequenos animais. No entanto, a possibilidade de disseminação de *Candida* spp. para diversos tecidos é uma realidade cada vez mais próxima da medicina veterinária (MUELLER et al., 2002; MORETTI et al., 2004).

2.5 *Candida rugosa*

O primeiro isolamento de *Candida rugosa* foi realizado em 1917, por Anderson, a partir de fezes humanas e foi denominada *Mycoderma rugosa* (MORETTI et al., 2000). Em 1942, foi reclassificada como *C. rugosa* por Diddens e Lodder (MEYER et al., 1998). Em 2015, com base em aspectos moleculares e filogenéticos estudados por Khunnamwong et al., foi proposta a modificação de oito espécies do gênero *Candida* para um novo gênero *Diutina*, entre elas *Diutina rugosa*.

C. rugosa apresenta colônias de coloração branco a creme, com aspecto enrugado. Microscopicamente observam-se blastoconídeos e pseudo-hifas (SCHAECHTER, 2009). Essa espécie é bastante pesquisada e utilizada em processos industriais (HADEBAL, 1991). Lipases de *C. rugosa* são descritas desde os anos 1960 e empregadas extensivamente na hidrólise e síntese de uma ampla

gama de ésteres de interesse comercial (TOMIZUKA et al., 1966; DE MARIA et al., 2006).

Como patógeno, até a década de 1980, *C. rugosa* era considerada importante principalmente na medicina veterinária, pois comumente era associada a casos de mastite em bovinos (MCDONALD et al., 1980). Em 1985 foram relatados os primeiros casos de fungemia em humanos por esse micro-organismo em duas diferentes instituições dos Estados Unidos (REINHARDT et al., 1985; SUGAR & STEVENS, 1985).

O isolamento esporádico de *C. rugosa* tem sido reportado em diversos centros hospitalares de todo o mundo. Dubé et al. (1994) relataram o aumento da incidência de infecções por *C. rugosa* após o uso de nistatina tópica em uma unidade de queimados, os testes de suscetibilidade mostraram resistência à droga. Ng et al. (1998) relataram a ocorrência de sete culturas positivas para *C. rugosa* em um estudo realizado na Malásia, sendo três de sangue, dois de urina e dois de pele. Posteriormente, estes mesmos autores relataram mais sete casos de candidemia por *C. rugosa* entre os anos de janeiro de 1997 a outubro de 1999, número que correspondia a 4% das infecções fúngicas detectadas neste período (NG et al., 2001).

Em outro estudo com base em dados de dez anos de um hospital na Eslováquia, a partir de 75 culturas positivas para *Candida* oriundas de 45 pacientes com câncer em somente uma era *C. rugosa*. O isolamento de todas as cepas deste estudo estava relacionado ao tratamento profilático dos pacientes com fluconazol (KRCMERY et al., 1999).

A partir de um estudo ao longo de três anos (2004 a 2007) realizado em cinco hospitais no México, constituído por 398 isolados de hemocultura, somente duas cepas de *C. rugosa* foram obtidas (GONZÁLEZ et al., 2008). Na Polônia, a partir de 161 cepas de fungos provenientes de pacientes com doença renal crônica *C. albicans* foi a espécie mais prevalente e *C. rugosa* correspondeu a 2,48% dos isolados (DROZDOWSKA, 2007). Na Turquia, um trabalho avaliou 21 casos de peritonite fúngica e *C. rugosa* foi responsável por um destes (UNAL et al., 2010).

Em um surto de candidemia no Brasil, embora as culturas tenham sido classificadas como sensíveis a anfotericina B, fluconazol e flucitosina, quatro de seis pacientes que estavam sendo tratados com anfotericina B foram a óbito, outro paciente que não estava sendo tratado também faleceu. Todos os pacientes

apresentavam múltiplos fatores de risco, como realização de diálise, uso de cateter, ventilação mecânica e antibioticoterapia (COLOMBO et al, 2003).

C. rugosa coloniza frequentemente pacientes de alto risco internados em Unidades de Terapia Intensiva e exibe uma redução da sensibilidade a poliênicos e ao fluconazol (HERNANDEZ et al., 2004). Um estudo publicado por Mincez et al. (2009) também relatou um caso de candidemia por *C. rugosa* em paciente com fatores predisponentes, como a existência de uma doença primária (doença de Crohn), recebimento de nutrição parenteral e uso de fármaco imunossupressor.

Fatores de virulência não foram muito estudados nesta espécie. Cepas testadas por Terçarioli (2009) apresentaram baixa atividade de proteinase, produção nula de fosfolipase e baixa ou média produção de biofilme. O único suposto fator de virulência expresso de maneira considerável pelas cepas foi a produção de lipase. Outro estudo, com amostras de *Candida* isoladas de mastite, *C. rugosa* correspondeu a 34 das 207 amostras isoladas. A atividade hemolítica das cepas foi testada e *C. rugosa* mostrou ser produtora de alfa-hemólise (SEKER, 2009). Em trabalho realizado por Queiroz et al. (2015) uma amostra de *C. rugosa* demonstrou alta capacidade de adesão em superfícies abióticas e formação de biofilme.

Existem poucos estudos *in vivo* sobre a eficácia de fármacos em infecções por *C. rugosa*, mas um trabalho com camundongos infectados avaliou o tratamento com anfotericina B, fluconazol, voriconazol e posaconazol e todas as drogas foram efetivas no prolongamento da sobrevivência e redução da carga fúngica tecidual (HERNANDEZ et al., 2004). Outro estudo demonstrou eficácia de anidulafungina e caspofungina frente a infecções experimentais por esta levedura (SANCHIS et al., 2016).

Em animais, a maior parte dos relatos de infecção por *C. rugosa* está relacionada a casos de mastite. Porém, existem alguns relatos desta espécie causando outras doenças. *C. rugosa* foi associada a metrite em égua (GIORGI et al., 1986). A levedura também foi isolada a partir do trato digestório de perus (MORETTI et al., 2000). Pressler et al. (2003) em estudo com 13 cães e sete gatos com problemas no trato urinário, isolaram *C. rugosa* a partir de infecções de dois cães. Todos os animais analisados no estudo possuíam algum comprometimento local ou sistêmico que provavelmente serviu como fator predisponente para a infecção.

Vital et al. (2002) isolaram sete cepas de *C. rugosa* de amostras de solo da região amazônica, o que mostra que o solo é possivelmente um dos nichos que esta

levedura pode ocupar. Medina et al. (2017) em estudo sobre a importância de pombos e suas excretas como reservatórios de leveduras que podem ser patogênicas, isolaram *C. rugosa* em uma amostra de fezes e em uma amostra da cavidade oral. Da mesma forma, Vidotto & Gallo (1985) também encontraram esta espécie em fezes de pombos. Gallo et al. (1989) encontraram 25 espécies de leveduras em fezes de pombos, incluindo *C. rugosa*.

No Brasil, em estudo sobre a etiologia de mastite clínica e subclínica em propriedades do estado de São Paulo, foram isolados 251 (12,07%) fungos, destes 208 leveduras, sendo 20 espécies de *Candida*, entre elas *C. rugosa* (COSTA et al., 1993). *C. rugosa* foi a segunda espécie mais prevalente em estudo com amostras de leite provenientes de bovinos com mastite clínica e subclínica em outro trabalho também conduzido no Brasil (SANTOS & MARIN, 2005). Costa et al. (2008) em levantamento de rebanhos leiteiros do estado de Minas Gerais encontraram apenas 57 leveduras entre as mais de mil amostras analisadas e destas, duas amostras positivas para *C. rugosa*.

Crawshaw et al. (2005) identificaram *C. rugosa* como responsável por casos de mastite após o uso de antibióticos intramamários. Scaccabarozzi et al. (2011) isolaram *C. rugosa* de amostras de leite e do ambiente, como fezes, ração, cama e pele das vacas. Quatorze vacas foram diagnosticadas com mastite causada por este fungo, dez tiveram cura espontânea, porém as outras quatro foram abatidas devido a infecção intramamária persistente.

Na China, fungos foram responsáveis por 35,6% dos casos de mastite clínica em um surto, com 16 amostras sendo positivas para *C. rugosa* (11,9%, entre os agentes fúngicos). Os animais apresentavam sinais de mastite clínica e foram tratados com antibióticos e corticoides (ZHOU et al., 2013). Em estudo conduzido na Argélia, *C. rugosa* foi identificada como causa de mastite clínica e subclínica (KSOURI et al., 2015).

2.6 Suscetibilidade de *Candida rugosa*

Estudo realizado em quatro hospitais de São Paulo, Brasil, 25 cepas de *C. rugosa* foram isoladas, sendo 24 do mesmo local. A suscetibilidade das amostras foi testada e as concentrações mínimas encontradas que foram capazes de inibir 90% (CIM₉₀) dos isolados foram 1 µg/mL para anfotericina B; 64 µg/mL para fluconazol;

0,5 µg/mL para itraconazol e flucitosina e >16 µg/mL para caspofungina (COLOMBO et al., 2007).

Utilizando-se da metodologia de microdiluição em caldo, da Matta et al. (2007), avaliaram 25 cepas de *C. rugosa* isoladas de sangue, provenientes de 4 hospitais terciários da cidade de São Paulo isolados entre 1995 e 2003, e os resultados encontrados demonstraram baixa suscetibilidade aos antifúngicos fluconazol (CIM₉₀ = 32µg/mL), itraconazol (CIM₉₀ = 0,5µg/mL) e voriconazol (CIM₉₀ = 0,5 µg/mL). Nenhum isolado evidenciou CIM acima de 2 µg/mL para anfotericina B e acima de 8 µg/mL para flucitosina, o que foi considerado como 100% de sensibilidade para essas drogas, de acordo com os *breakpoints* utilizados pelos autores.

Dados obtidos a partir do ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program, referente aos anos 1997 a 2003, em estudo de Pfaller et al. (2006) demonstraram que *C. rugosa* representava 0,4% dos 134.715 isolados de *Candida* spp. Este patógeno apresentou distribuição mundial, sendo muito comum na América Latina. A suscetibilidade dos isolados aos antifúngicos fluconazol e voriconazol apresentou variações entre as regiões geográficas, e baixa suscetibilidade foi observada principalmente na América Latina e Ásia-Pacífico.

Posteriormente, Pfaller et al. (2010) analisaram os dados obtidos no mesmo programa para dez anos (1997 a 2007), reunindo 638 isolados clínicos de *C. rugosa* e seus dados de suscetibilidade para dois antifúngicos azólicos. O isolamento desta espécie aumentou ao longo dos anos e a maioria dos isolados eram provenientes da América Latina. Sobre o perfil de suscetibilidade, foi observada resistência em 41,8% para fluconazol e 21,2% para voriconazol.

Em estudo com 4625 amostras de *Candida* spp. isoladas de hospitais de São Paulo em um período de cinco anos (1999-2003) foram encontradas 292 *C. rugosa*. Ao avaliar essas amostras através da técnica de disco difusão, valores altos de CIM foram encontrados. A concentração de antifúngico necessária para inibir o crescimento de 50% das cepas foi de 100,12µg/mL para fluconazol e 0,76 µg/mL para voriconazol (AZEVEDO et al., 2010).

Madhavan et al. (2010) avaliaram a atividade *in vitro* de fluconazol e voriconazol frente a seis cepas de *C. rugosa*, através do método Etest. Voriconazol apresentou melhor atividade, com CIM variando entre 0,003 µg/mL a 0,094 µg/mL; enquanto para fluconazol a variação encontrada foi de 0,094 µg/mL a 12 µg/mL.

Três estudos avaliaram casos de candidemia em centros de trauma na Índia. No trabalho conduzido por Behera et al. (2010) foram encontradas 28 amostras provenientes de 19 pacientes positivas para *C. rugosa* e 25 amostras de *C. rugosa* no estudo de Singh et al. (2011). Todos os isolados foram sensíveis para flucitosina, anfotericina B e voriconazol, enquanto foi encontrado 21% de resistência ao fluconazol (BEHERA et al., 2010) e, no outro estudo, os autores detectaram 16% de resistência ao fluconazol (SINGH et al., 2011). Os achados apontam que todos os pacientes apresentavam fatores de risco, como realização de procedimentos médicos invasivos, muitos utilizando cateter venoso central e receberam antibioticoterapia. Outro trabalho publicado por Tak et al. (2014) demonstrou que *C. rugosa* foi responsável por 20 dos 212 casos de candidemia relatados. A suscetibilidade das amostras foi avaliada através do sistema Vitek 2 (bioMerriex), não foi observada resistência para anfotericina B, flucitosina e voriconazol; e uma amostra apresentou resistência ao fluconazol.

Paredes et al. (2012) avaliaram a suscetibilidade *in vitro* pelo método de microdiluição em caldo de 10 cepas de *C. rugosa*. As concentrações mínimas encontradas que foram capazes de inibir 90% (CIM₉₀) dos isolados testados foram: anfotericina B 1 µg/mL; fluconazol 2 µg/mL; voriconazol 0,03 µg/mL; itraconazol 0,12 µg / mL; micafungina 0,5 µg/mL; anidulafungina 0,25 µg/mL; caspofungina 1 µg/mL.

Em estudo realizado em Kunming, cidade da China, sobre a presença de leveduras na cavidade oral em 851 indivíduos hígidos e 604 infectados com vírus HIV, foi isolado *C. rugosa* em apenas um paciente HIV positivo. A suscetibilidade da amostra foi testada através de microdiluição em caldo e os resultados foram CIM 1µg/mL para fluconazol, 0,0031 µg/mL para itraconazol e voriconazol e 0,5 µg/mL para anfotericina B, sendo sensível a todos os antifúngicos testados (LI et al., 2013).

Espinel-Engroff et al. (2014) documentaram a distribuição de CIM encontradas para *Candida rugosa* de diferentes laboratórios. Os dados de CIM do fluconazol variaram de 0,12 µg/mL a 16 µg/mL, com maior número de cepas com CIM 1 µg/mL e 2 µg/mL. Para o voriconazol as CIM variaram entre 0,008 µg/mL e 0,25 µg/mL, com prevalência de 0,03 µg/mL.

Adjapong et al. (2015) publicaram o primeiro isolamento de *C. rugosa* de amostra clínica em hospital de Gana, na África. A suscetibilidade da amostra foi testada através do método Etest para os antifúngicos fluconazol, itraconazol e voriconazol. Os resultados demonstraram resistência ao fluconazol (CIM de 24

µg/mL). A suscetibilidade de um isolado foi testada por Queiroz et al. (2015) pelo método de microdiluição em caldo e as CIM encontradas foram: 1 µg/mL para anfotericina B, 2 µg/mL para nistatina, 0,0625 µg/mL para itraconazol, 2 µg/mL para voriconazol e 8 µg/mL para o fluconazol.

Dados sobre a suscetibilidade de cepas de *C. rugosa* isoladas de animais são raros. Um estudo sobre o isolamento de leveduras a partir de animais encontrou uma amostra de *C. rugosa*, que foi testada através do kit comercial Fungitest (Bio-Rad Laboratories), e foi considerada sensível aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol, cetoconazol, itraconazol e flucitosina (HAMAL & KOUKALOVÁ, 2010).

A atividade de óleos essenciais sob *C. rugosa* não foi muito explorada ainda. O efeito inibitório do óleo essencial de *Mesembryanthemum edule*, uma planta medicinal utilizada por curandeiros na África do Sul, foi testado por Omoruyi et al. (2014) frente a espécies de *Candida spp* e *Cryptococcus neoformans*, apresentando CIM de 80 µg/mL para *C. rugosa*.

3 MANUSCRITO

Manuscrito a ser submetido a revista científica com qualificação mínima Qualis B2.

Evaluation of the susceptibility profile of *Candida rugosa* (*Diutina rugosa*) against antifungals and essential oils

Aline Ludwig¹, Francielli Pantella Kunz de Jesus¹, Valéria Dutra², Stefhano Luis Cândido², Sydney Hartz Alves³, Janio Moraes Santurio^{1*}

1 Laboratório de Pesquisas Micológicas, Programa de Pós graduação em Farmacologia, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

2 Programa de Pós graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Mato Grosso, Cuiabá, Brazil.

3 Laboratório de Pesquisas Micológicas, Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil.

Running head: *In vitro* susceptibility of *Candida rugosa*.

Key words: *Candida rugosa*, *Diutina rugosa*, antifungal activity, susceptibility, essential oils.

* Corresponding author: Prof. Dr. Janio M Santurio (janio.santurio@gmail.com), Laboratório de Pesquisas Micológicas, Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Campus UFSM, Prédio 20, Sala 4139, Universidade Federal de Santa Maria, 97105 -900 Santa Maria, RS, Brazil. Phone/Fax: + 55 55 3220 8906

Summary

Candida rugosa (recently reclassified *Diutina rugosa*) is an emerging pathogen affecting humans and animals. *Candida* resistance to existing drugs is an important factor to be monitored, as well as the need of researching alternatives to conventional antifungals. Here, we evaluated the *in vitro* effects of some antifungals and essential oils by the broth microdilution method (CLSI M27-A3) against fifteen *C. rugosa* strains from animals isolated and molecularly identified. The results showed MIC₉₀ of: 0.125 µg/mL to ketoconazole and voriconazole, 0.25 µg/mL to micafungin, 0.5 µg/mL to anidulafungin, 1 µg/mL to caspofungin, 2 µg/mL to amphotericin B, itraconazole and flucytosin, 8 µg/mL to fluconazole, 16 µg/mL to nystatin and >128 µg/mL to terbinafine. The compounds carvacrol (MIC₉₀ 320 µg/mL), thimol (MIC₉₀ 320 µg/mL) and cinnamaldehyde (MIC₉₀ 160 µg/mL) and essential oils of oregano (MIC₉₀ 320 µg/mL), cassia (MIC₉₀ 320 µg/mL) and basil (MIC₉₀ 320 µg/mL) demonstrated antifungal activity against the samples tested. Moreover, the essential oils of black pepper and rosemary were tested but did not present activity in the concentration used (320 µg/mL).

Key words: *Candida rugosa*, *Diutina rugosa*, antifungal activity, susceptibility, essential oils.

1. Introduction

Candida rugosa (recently reclassified as *Diutina rugosa*,¹) was first isolated from human feces² by Anderson, H. W. in 1917. Lipases from this species are highly studied and used for biotechnological and industrial applications.³ Considered at first as a pathogen of veterinary medicine relevance due, mainly, to its involvement in mastitis⁴, today *C. rugosa* is emerging as an agent of human infections in different parts of the world especially in Latin America.^{5,6}

C. rugosa infections in humans are often related to immunocompromised patients who underwent invasive medical practices such as the use of catheters or previous surgery.^{7,8} The description of fungemia by this species first occurred in 1985 in two different institutions in the United States.^{9,10} Since then, many others cases of candidaemia by *C. rugosa* have been reported.^{11,12,7,13,8,14,15}

Resistance to antifungal agents has increased in *Candida* spp., especially in non-*albicans* species. *C. rugosa* apparently presents low susceptibility to azoles⁵ and amphotericin B.¹⁶ It is important to highlight that this possible resistance, makes epidemiological surveillance studies important.

The propagation of fungal infections and the decreased activity of commercially available drugs lead to the need of expanding the antifungal drugs stock. In addition, the importance of research on alternative treatments is evident with special attention to medicinal plants. The antifungal activity of essential oils and their components have already been reported by several authors.^{17,18,19,20,21}

Therefore, the aim of this research was to investigate the susceptibility profile of a *C. rugosa* samples collection isolated from animals against antifungal agents commonly used in human and veterinary medicine. In addition, we aimed to check the inhibitory capacity of some essential oils and major compounds against this yeast. The *in vitro* activities were determined by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) broth microdilution reference method.

2. Materials and methods

2.1 Microorganisms

Fifteen clinical samples of *C. rugosa* obtained from animals naturally infected were used in this study (Table 1). All clinical isolates were previously identified by

morphological analysis, as well as polymerase chain reaction (PCR) and DNA sequencing of ITS region.

2.2 Chemicals

2.2.1 Antifungal agents

The drugs were obtained commercially, fluconazole (FLU), ketoconazole (KTZ), itraconazole (ITZ), voriconazole (VRZ), flucytosine (FCS), amphotericin B (AMB), caspofungin (CAS), nystatin (NYS) and terbinafine (TRB) from Sigma Aldrich, St. Louis, USA; Anidulafungin (ADF) from Merck, Germany and micafungin (MCF) from Astellas, Japan. The stock solution for FLU was prepared by dissolving the powder in distilled water. The stocks solutions for the other drugs were dissolved in dimethyl sulphoxide. Moreover, the intermediate solutions were prepared in RPMI 1640 broth tamponed with 3-(*N-morpholino*) *propanesulfonic acid* (MOPS), according to the guidelines M27 – A3 of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

2.2.2 Essential oils

The essential oils *Origanum vulgare* (oregano), *Ocimum basilicum* (basil), *Piper nigrum* (black pepper) and the major components carvacrol, thymol and cinnamaldehyde were obtained from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). *Cinnamomum cassia* (cassia) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary) were purchased from Ferquima Ind. & Com. Ltda (Vargem Grande Paulista, Brazil). The essential oils were first diluted in ethanol and subsequently diluted in RPMI 1640 broth tamponed with MOPS.

2.3. *In vitro* susceptibility test

In order to evaluate the *in vitro* susceptibility, we used the broth microdilution technique according to the international protocols M27 - A3 and M27 – S4 of Clinical and Laboratory Standards Institute.^{22,23} The highest concentrations studied were 320 µg/mL for the essential oils, 128 µg/mL for TRB, FLU and NYS; 4 µg/mL for ITZ, VRZ and KTZ; 2 µg/mL for ADF, CAS and MCF; 32 µg/mL for AMB and FCS. The yeast inoculum was adjusted with a spectrophotometer and the final concentration obtained was 0.5×10^3 to 2.5×10^3 CFU/mL. The plates were incubated at 35°C for 24h to echinocandins and for 48h to the others drugs. After the incubation period, we

observed the growths and the minimal inhibitory concentration (MIC) were determined. The MIC for azoles, echinocandins and FCS were defined as the lowest concentration with decrease of 50% in turbidity compared with positive control. However, for AMB, NYS and the essential oils the lowest concentration with 100% of inhibition was considered the MIC.

2.4 Interpretation of MIC values

In the absence of specific breakpoints for *C. rugosa* the criteria for susceptibility to the antifungal agents tested were defined according to guidelines proposed by CLSI to *Candida albicans* and previous studies which are presented in Table 2. There are no breakpoints established for nystatin, terbinafine and the essential oils.

3. Results

3.1 Antifungals

The results of the *in vitro* susceptibility of 15 samples *C. rugosa* tested against antifungals and the variations in the percentage of susceptibility can be observed in Table 2.

Based on the data obtained, the drugs with the best *in vitro* activity were MCF and KTZ with 100% susceptible, followed by VRZ and FCS with 93.3% susceptible. Besides this we also tested TRB, however, none strain showed inhibition with the tested concentration (128 µg/mL).

3.2 Essential oils

The oils *O. vulgare*, *C. cassia*, *O. basilicum* and the components carvacrol, thimol and cinnamaldehyde presented inhibitory activity against the samples of *C. rugosa* tested. The minimal inhibitory concentrations (MICs) are showed in Table 3.

Based on the parameters of susceptibility as shown in Table 3, cinnamaldehyde presented the best activity against the strains tested with MIC₉₀ 160 µg/mL and variation of 40 µg/mL to 160 µg/mL. *O. basilicum* showed the highest MIC, 320 µg/mL to all samples tested.

In addition, we also tested the essential oils rosemary and black pepper, but they were not able to inhibit the strains of *C. rugosa* at the concentration tested (320 µg/mL).

4. Discussion

In vitro susceptibility tests are important to monitor antifungal resistance and define the most effective therapy for infections. There are few data in literature about the susceptibility of *C. rugosa*. A previous study on the isolation of yeasts from animals carried out by Hamal and Koukalová (2010) found one sample of *C. rugosa*, which was considered sensitive for AMB, FLU, KTZ, ITZ, FCS and miconazole, using a commercial method called Fungitest kit (Bio-Rad Laboratories).²⁴ Although no specific breakpoints for *C. rugosa* have been determined yet, the importance of knowing the susceptibility profile of this species stands on its representation of an emerging pathogen.

Pfaller and collaborators⁶ collected data for over ten years from ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Program, showing that the rates of *C. rugosa* isolation increased over the years and most of the isolates were from Latin America. About the susceptibility profile displayed in previous works, *C. rugosa* resistance was found to FLU (41.8% R⁶; 57.9%R²⁵; 100%R²⁶) but these studies used different methodology (Disk diffusion and E-test). Interestingly enough, we found different results for this drug with 26.7% SDD and 13.3% R. These results go in agreement with some authors that found less resistance to fluconazole.^{7,27,14,15,15,28}

In our research we found only one isolate SDD for VRZ. Other studies are in agreement with this finding, showing high susceptibility to this drug.^{29,14,27,15,28,30,26} Ketoconazole also showed to be effective against *C. rugosa*, which has also been shown previously.³¹ In this sense, Espinel-Engroff and contributors³² documented the distribution of MICs found for *C. rugosa* from different laboratories showing that the data for FLU are similar to what we found. In our research, however, most isolates showed lower MICs for VRZ. The results we obtained for ITZ demonstrate low susceptibility to this agent and contradict some literature data. This difference can perhaps be explained due to two facts: (1) most of these studies were performed with only one isolate; and (2) they made use of different methodology.^{29,28,30,31,26}

MCF showed the best activity among the echinocandins in our tests, followed by ADF, while CAS showed only 20% susceptible. Similar data was found previously^{28,31}, however, there is one study which reported low susceptibility to all three echinocandins.¹⁶ When evaluating the efficacy of flucytosine, we found 93.3% of sensibility, with MIC₉₀ 2 µg/mL, corroborating with previous studies.^{7,14,15,31} Moreover, we found some resistance to AMB (33.3% R), that was also seen in some

previous studies^{16,33} and differing from others.^{7,29,15,28} In this regard, a third possible explanation for the distinct findings is the origin of the species, since the studies evaluated isolates from humans.

A study conducted by Dubé et al (1994)¹¹ reported an increase in the incidence of *C. rugosa* infections in humans after the use of topical nystatin in a burned unit and susceptibility tests showed resistance to the drug. In our research, NYS showed MIC ranging from 1 µg/mL – 16 µg/mL. A recent work with other *Candida* species showed MIC for NYS ranging from 2 µg/mL to >16 µg/mL.³⁴

The increased antimicrobial resistance and the limited number of antifungal agents are fundamental concerns that justify the development of research for alternative treatments. In this way, we evaluated the inhibitory potential of several essential oils against *C. rugosa*. To the best of our knowledge this is the first study about efficacy of these essential oils against *C. rugosa*. So far, only one essential oil (*Mesembryanthemum edule*) has been reported to inhibit the growth of this species, having MIC 80 µg/mL.²⁰

Carvacrol and thimol are phenolic monoterpenes predominantly present in the essential oil of *O. vulgare*.^{35,36} The antifungal activity of these monoterpenes has already been described.^{37,38,39} More specifically, previous studies have proven the ability of oregano essential oil to inhibit *Candida species*,^{40,41,42,43}. These results go in agreement with our findings, since in our study MIC values ranged from 160 µg/mL to 320 µg/mL and MIC₉₀ 320 µg/mL. *O. basilicum* essential oil presents linalool, a monoterpene, as the major component and was able to inhibit the growth of all tested strains of *C. rugosa* with MIC value of 320 µg/mL. This effect goes in both agreement^{42,43} and disagreement⁴⁰ with some findings of the literature.

Cinnamaldehyde⁴⁴ is the main constituent of cinnamon essential oil and it has been reported that this compound has several activities, such as antioxidant, antimicrobial and antifungal.⁴⁵ In this work, cinnamaldehyde presented the best antifungal activity among the oils tested. The essential oil of *C. cassia* was able to inhibit the yeasts with MIC₉₀ 320 µg/mL. The activity of this oil against other species of *Candida* has been already reported.^{46,47}

In our study, *R. officinalis* and *P. nigrum* essential oils did not inhibit the *C. rugosa* strains growth with the highest concentration tested (320 µg/mL). Despite the fact that some literature data point out their inhibitory efficiency against *Candida* species.^{51,43,52} Our study is in accordance with some works,^{40,48,49,50}. Nonetheless,

further studies should be carried out to verify if these oils can inhibit *C. rugosa* at higher concentrations.

In summary, we demonstrated the susceptibility profile of a small collection of *C. rugosa*, which presented good sensitivity for micafungin, flucytosine, voriconazole, ketoconazole, anidulafungin. However, some resistance level was found for itraconazole, fluconazole, amphotericin B, caspofungin and nystatin. It is important to note that due to the small number of isolates evaluated in this study and the lack of information in the literature, mainly about animals isolates, it is difficult to characterize a susceptibility profile of *C. rugosa*. The importance of the use of standardized methodologies and the determination of species-specific breakpoints is evident. In addition, we demonstrated *in vitro* antifungal activity of some essential oils and major compounds that may represent alternatives for use in *C. rugosa* infections. This work is a starting point for more detailed *in vivo* studies required to confirm the efficacy and safety of drug treatment.

Acknowledgments

Aline Ludwig is financially supported by fellowships from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

1. Khunnamwong P, Lertwattanasakul N, Jindamorakot S, Limtong S, Lachance MA. Description of diutina gen. nov diutina siamensis, f.a. Sp. Nov and reassignment of candida catenulata, candida mesorugosa, candida neorugosa, candida pseudorugosa, candida ranongensis, candida rugosa and candida scorzettiae to the genus diutina. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2015;65(12):4701-4709.
2. Moretti A, Piergili Fioretti D, Boncio L, Pasquali P, Del Rossi E. Isolation of Candida rugosa from Turkeys. *J Vet Med Ser B.* 2000;47(6):433-439.
3. Domínguez de María P, Sánchez-Montero JM, Sinisterra J V., Alcántara AR. Understanding Candida rugosa lipases: An overview. *Biotechnol Adv.* 2006;24(2):180-196.
4. McDonald JS, Richard JL, Anderson AJ, Fichtner RE. In vitro antimycotic sensitivity of yeasts isolated from infected bovine mammary glands. *Am J Vet Res.* 1980;41(12):1987-1990.
5. Pfaller MA, Diekema DJ, Colombo AL, et al. Candida rugosa, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: Geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. *J Clin Microbiol.* 2006;44(10):3578-3582.
6. Pfaller MA, Diekema DJ, Gibbs DL, et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-year analysis of susceptibilities of Candida Species to fluconazole and voriconazole as determined by CLSI standardized disk diffusion. *J Clin Microbiol.* 2010;48(4):1366-1377.
7. Colombo AL, Azevedo Melo AS, Crespo Rosas RF, et al. Outbreak of Candida rugosa candidemia: An emerging pathogen that may be refractory to amphotericin B therapy. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 2003;46(4):253-257.
8. Minces LR, Ho KS, Veldkamp PJ, Clancy CJ. Candida rugosa: a distinctive emerging cause of candidaemia. A case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis.* 2009;41(11-12):892-897.
9. Reinhardt JF, Ruane PJ, Walker LJ, George WL. Intravenous catheter-associated fungemia due to Candida rugosa. *J Clin Microbiol.*

- 1985;22(6):1056-1057.
10. Sugar AM, Stevens DA. *Candida rugosa* in immunocompromised infection. Case reports, drug susceptibility, and review of the literature. *Cancer*. 1985;56(2):318-320.
 11. Dube MP, Heseltine PNR, Rinaldi MG, Evans S, Zawacki B. Fungemia and Colonization with Nystatin-Resistant *Candida rugosa* in a Burn Unit. *Clin Infect Dis*. 1994;18:77-82.
 12. Krcmery V, Mrazova M, Kunova A, et al. Nosocomial candidaemias due to species other than *Candida albicans* in cancer patients. Aetiology, risk factors, and outcome of 45 episodes within 10 years in a single cancer institution. *Support Care Cancer*. 1999;7(6):428-431.
 13. Hanzen J, Krcmery V. Polyfungal candidaemia due to *Candida rugosa* and *Candida pelliculosa* in a haemodialyzed neonate. *Scand J Infect Dis*. 2002;34(7):555.
 14. Behera B, Singh RI, Xess I, Mathur P, Hasan F, Misra MC. *Candida rugosa*: a possible emerging cause of candidaemia in trauma patients. *Infection*. 2010;38(5):387-393.
 15. Singh RI, Xess I, Mathur P, Behera B, Gupta B, Misra MC. Epidemiology of candidaemia in critically ill trauma patients: Experiences of a level I trauma centre in North India. *J Med Microbiol*. 2011;60(3):342-348.
 16. Diekema DJ, Messer SA, Boyken LB, et al. In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth microdilution methods. *J Clin Microbiol*. 2009;47(10):3170-3177.
 17. Rózalska B, Sadowska B, Wieckowska-Szakiel M, Budzyńska A. [The synergism of antifungals and essential oils against *Candida* spp. evaluated by a modified gradient-diffusion method]. *Med Dosw Mikrobiol*. 2011;63(2):163-169.
 18. Silva F, Ferreira S, Duarte A, Mendonça DI, Domingues FC. Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B. *Phytomedicine*. 2011;19(1):42-47.
 19. Khan MSA, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant

- isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2012;50(1):33-42.
20. Omoruyi BE, Afolayan AJ, Bradley G. The inhibitory effect of *Mesembryanthemum edule* (L.) bolus essential oil on some pathogenic fungal isolates. *BMC Complement Altern Med*. 2014;14:1-7.
 21. Pereira FG, Marquete R, Domingos LT, et al. Antifungal activities of the essential oil and its fractions rich in sesquiterpenes from leaves of *Casearia sylvestris* Sw. *An Acad Bras Cienc*. 2017;89(4):2817-2824.
 22. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts, 3rd Edition, Approved Standard M27-A3*. Vol 28.; 2008.
 23. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Fourth Informational Supplement. CLSI document M27-S4. 2012.
 24. Hamal P, Koukalová D. [Yeasts in domestic animals: species identification and susceptibility to antifungals]. *Klin Mikrobiol Infekc Lek*. 2010;16(1):4-9.
 25. Azevedo AC, Bizerra FC, da Matta DA, de Almeida LP, Rosas R, Colombo AL. In Vitro Susceptibility of a Large Collection of *Candida* Strains Against Fluconazole and Voriconazole by Using the CLSI Disk Diffusion Assay. *Mycopathologia*. 2011;171(6):411-416.
 26. Adjapong G, Bartlett M, Hale M, Garrill A. The isolation of *Candida rugosa* and *Candida mesorugosa* from clinical samples in Ghana. *Med Mycol*. 2016;54(3):322-326.
 27. Madhavan P, Jamal F, Chong PP, Ng KP. In vitro activity of fluconazole and voriconazole against clinical isolates of *Candida* spp. by E-test method. *Trop Biomed*. 2010;27(2):200-207.
 28. Paredes K, Sutton DA, Cano J, et al. Molecular identification and antifungal susceptibility testing of clinical isolates of the *Candida rugosa* species complex and proposal of the new species *Candida neorugosa*. *J Clin Microbiol*. 2012;50(7):2397-2403.
 29. Ostrosky-zeichner L, Rex JH, Pappas PG, et al. Antifungal Susceptibility Survey of 2,000 Bloodstream. *Society*. 2003;47(10):3149-3154.
 30. Li Y-Y, Chen W-Y, Li X, et al. Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. *BMC Infect Dis*. 2013;13(1):46.

31. Santhanam J, Nazmiah N, Aziz MN. Species distribution and antifungal susceptibility patterns of *Candida* species: Is low susceptibility to itraconazole a trend in Malaysia? *Med J Malaysia*. 2013;68(4):343-347.
32. Espinel-Ingroff A, Pfaller MA, Bustamante B, et al. Multilaboratory study of epidemiological cutoff values for detection of resistance in eight *Candida* species to fluconazole, posaconazole, and voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;58(4):2006-2012.
33. da Matta D, Paula L, Almeida D, et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in Sa. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2007;57(4):399-404.
34. Brandolt TM, Klafke GB, Gonçalves CV, et al. Prevalence of *Candida* spp. in cervical-vaginal samples and the in vitro susceptibility of isolates. *Brazilian J Microbiol*. 2017;48(1):145-150.
35. Adam K, Sivropoulou A, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. Antifungal Activities of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Mentha spicata*, *Lavandula angustifolia*, and *Salvia fruticosa* Essential Oils against Human Pathogenic Fungi. *J Agric Food Chem*. 1998;46(5):1739-1745.
36. Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J Agric Food Chem*. 2001;49(9):4168-4170.
37. Lambert, R J, Skandamis, P N, Coote PJ, Nychas GJ. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *J Appl Microbiol*. 2001;91(3):453-462.
38. Ben Arfa A, Combes S, Preziosi-Belloy L, Gontard N, Chalier P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. *Lett Appl Microbiol*. 2006;43(2):149-154.
39. Botelho MA, Nogueira NAP, Bastos GM, et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian J Med Biol Res = Rev Bras Pesqui medicas e Biol*. 2007;40(3):349-356.
40. Pozzatti P, Scheid LA, Spader TB, Atayde ML, Santurio JM, Alves SH. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. *Can J Microbiol*. 2008;54(11):950-956.

41. Rosato A, Vitali C, Piarulli M, Mazzotta M, Argentieri MP, Mallamaci R. In vitro synergic efficacy of the combination of Nystatin with the essential oils of *Origanum vulgare* and *Pelargonium graveolens* against some *Candida* species. *Phytomedicine*. 2009;16(10):972-975.
42. Abrantes M, Lima OE, Araújo M, et al. Antifungal activity of essential oils on non *Candida albicans* yeasts. *Bras Farm*. 2013;94(3):227-233.
43. Ebani V, Nardoni S, Bertelloni F, Najjar B, Pistelli L, Mancianti F. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils against Pathogens Responsible for Otitis Externa in Dogs and Cats. *Medicines*. 2017;4(2):21.
44. Giordani R, Regli P, Kaloustian J, Portugal H. Potentiation of antifungal activity of amphotericin B by essential oil from *Cinnamomum cassia*. *Phytother Res*. 2006;20(1):58-61.
45. Singh G, Maurya S, DeLampasona MP, Catalan CAN. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. *Food Chem. Toxic*. 2007;45(9):1650-1661.
46. Ooi LSM, Li Y, Kam S-L, Wang H, Wong EYL, Ooi VEC. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. *Am J Chin Med*. 2006;34(3):511-522.
47. de Almeida L de FD, de Paula JF, de Almeida RVD, Williams DW, Hebling J, Cavalcanti YW. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. *Acta Odontol Scand*. 2016;74(5):393-398.
48. Pozzatti P, Loreto ES, Lopes PGM, Athayde ML, Santurio JM, Alves SH. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. *Mycoses*. 2009;53(1):12-15.
49. Pozzatti P, Loreto ÉS, Nunes Mario DA, Rossato L, Santurio JM, Alves SH. Inhibition de la formation de tube germinatif de *Candida albicans* et de *Candida dubliniensis* par diverses huiles essentielles. *J Mycol Med*. 2010;20(3):185-189.
50. Soares IH, Loreto ÉS, Rossato L, et al. In vitro activity of essential oils extracted from condiments against fluconazole-resistant and -sensitive *Candida glabrata*. *J Mycol Med*. 2015;25(3):213-217.
51. Ksouri S, Djebir S, Hadeif Y, Benakhla A. Survey of Bovine Mycotic Mastitis in Different Mammary Gland Statuses in Two North-Eastern Regions of Algeria.

- Mycopathologia*. 2015;179(3-4):327-331.
52. Nikolić MM, Jovanović KK, Marković TL, et al. Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of Citrus limon L., Piper nigrum L. and Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel essential oils. *J Pharm Pharmacol*. 2017;69(11):1606-1614.
 53. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Third Informational Supplement. CLSI document M27-S3, 2008.
 54. Rex JH, Pfaller MA. Has Antifungal Susceptibility Testing Come of Age? DEGREE OF CORRELATION BETWEEN IN VITRO AND IN. *Clin Infect Dis*. 2002;35:982-989.

Table 1 - Identification and origin of the strains.

Strain identification	Animal	GenBank access number
S35	<i>Bos taurus</i>	MF797709
S37	<i>Bos taurus</i>	MF797710
S41	<i>Bos taurus</i>	MF797711
S59	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797727
S126	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797736
S152	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797737
S156	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797738
S157	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797739
S189	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797741
S191	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797742
S209	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797745
S193	<i>Equus caballus</i>	MF797758
S28	<i>Spizaetus melanoleucus</i>	MF797762
S161	<i>Nasua nasua</i>	MF797771
S217	<i>Canis lupus familiaris</i>	MF797783

Table 2 – Susceptibility of *C. rugosa* against antifungals agents.

Antifungals	MIC₅₀(µg/mL)	MIC₉₀(µg/mL)	GM (µg/mL)	MIC range (µg/mL)	S (%)	SDD (%)	I (%)	R (%)
FLU^{1*}	2	8	2.4	1 – 64	60	26.7	-	13.3
ITZ²	2	2	1.26	0.25 – 4	-	26.7	-	73.3
KTZ^{3,4}	0.016	0.125	0.017	0.008 – 0.125	100	-	-	-
VRZ¹	0.016	0.125	0.035	0.008 – 0.5	93.3	6.7	-	-
FCS²	0.5	2	0.629	0.25 – 16	93.3	-	6.7	-
AMB³	1	2	1.203	0.5 – 2	66.7	-	-	33.3
NYS	8	16	9.624	1 - 16	-	-	-	-
TRB	-	>128	>128	>128	-	-	-	-
MCF¹	0.125	0.25	0.069	0.004 – 0.25	100	-	-	-
CAS¹	0.5	1	0.48	0.016 – 1	20	-	40	40
ADF¹	0.25	0.5	0.199	0.008 – 1	73.3	-	20	6.7

MIC₅₀ = Minimal inhibitory concentration for inhibition of 50% of isolates; MIC₉₀ = Minimal inhibitory concentration for inhibition of 90% of isolates; GM= Geometric mean; S= Susceptible; SDD= Susceptible dose dependent; I= Intermediate; R= resistant. Fluconazole (FLU), itraconazole (ITZ), ketoconazole (KTZ), voriconazole (VRZ), flucytosine (FCS), amphotericin B (AMB), nystatin (NYS), micagungin (MCF), caspofungin (CAS), anidulafungin (ADF). *1- CLSI M27 – S4, 2012²³; 2- CLSI M27 – S3, 2008⁵³; 3- CLSI M27 – A3, 2008²²; 4- Rex and Pfaller, 2002⁵⁴

Table 3 – Susceptibility ($\mu\text{g/mL}$) of *C. rugosa* against essential oils.

Essential Oils	MIC₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	MIC₉₀ ($\mu\text{g/mL}$)	GM ($\mu\text{g/mL}$)	MIC range ($\mu\text{g/mL}$)
Carvacrol	160	320	192.48	160 – 320
Thimol	160	320	221.11	160 – 320
Cinnamaldehyde	80	160	87.75	40 – 160
<i>O. vulgare</i>	320	320	291.75	160 – 320
<i>C. cassia</i>	160	320	175.49	160 – 320
<i>O. basilicum</i>	320	320	320	320
<i>P. nigrum</i>	> 320	>320	>320	>320
<i>R. officinallis</i>	>320	>320	>320	>320

MIC₅₀ = Minimal inhibitory concentration for inhibition of 50% of isolates; MIC₉₀ = Minimal inhibitory concentration for inhibition of 90% of isolates; GM = geometric mean.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo permitiram concluir que:

- Baseados nos *breakpoints* estabelecidos para *Candida albicans*, os antifúngicos micafungina, cetoconazol, voriconazol, flucitosina, anidulafungina, anfotericina B e fluconazol apresentaram ser efetivos contra *C. rugosa*, com sensibilidade de 100%; 100%; 93,3%; 93,3%; 73,3%; 66,7% e 60%, respectivamente. *C. rugosa* apresentou 73,3% de resistência ao itraconazol e 40% à caspofungina.

- Nistatina inibiu os isolados testados, apresentando CIM variando de 1 µg/mL a 16 µg/mL.

- Terbinafina não foi capaz de inibir *C. rugosa* nas concentrações testadas.

- Os óleos essenciais *Rosmarinus officinalis* (alecrim) e *Piper nigrum* (pimenta preta) não apresentaram atividade antifúngica frente a *C. rugosa* nas concentrações testadas.

- Os óleos essenciais de orégano, canela cássia, manjeriço e os compostos majoritários carvacrol, timol e cinamaldeído apresentaram atividade antifúngica *in vitro* frente às cepas de *C. rugosa* nas concentrações avaliadas.

REFERÊNCIAS

- ABRANTES, MA et al. Antifungal activity of essential oils on non *Candida albicans* yeasts. **Bras. Farm**, v. 94, n. 3, p. 227–233, 2013.
- AHMAD, A; KHAN, A. et al. Fungicidal activity of thymol and carvacrol by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. **Eur Journal Clin Microbiol Infect Dis** v.30, n. 1, p.41–50, 2011.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Jour. of Agric. and Food Chem.**, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas medicinais**. 2 ed. Salvador: EDUFBA, 2003. 216p.
- ARIKAN, S.; SANCAK, B.; HASCELİK, G. *In vitro* activity of caspofungin compared to amphotericin B, fluconazole and itraconazole against *Candida* strains isolated in a Turkish University Hospital Medical Mycology. **Med. Mycol.** v.43, p.171-178, 2005.
- AZEVEDO, A. C. et al. In Vitro Susceptibility of a Large Collection of *Candida* Strains Against Fluconazole and Voriconazole by Using the CLSI Disk Diffusion Assay. **Mycopathologia**. v.171, n.6, p.411-6., 2011.
- BALKIS, M. M. et al. Mechanisms of fungal resistance: an overview. **Drugs**, v.62, n.7, p.1025-1040, 2002.
- BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidíases. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.** v.22, n. 1, p.22- 38, 2010.
- BASER, K.H.C.; DEMIRCI, F. Chemistry of Essential Oils. In: Berger RG Ed, Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprospecting and Sustainability. **Heidelberg Springer**, p.43-86, 2007.
- BASSOLE, I. H. N. et al. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**. v.62 n.2 p.209–212. 2003.
- BEHERA, B. et al. *Candida rugosa*: a possible emerging cause of candidaemia in trauma patients. **Infection**. v.38, n.5, p.387-93, 2010.
- BEN-AMI, R.; LEWIS, R. E.; KONTOYIANNIS, D. P. Immunocompromised hosts: immunopharmacology of modern antifungals. **Clin. Infect. Dis**. v.47, n.2, p.226-235, 2008.
- BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v. 40,n.40, p. 349-356, 2007.
- BRAGA, P. C. et al. Inhibitory activity of thymol against the formation and viability of *Candida albicans* hyphae. **Mycoses** v. 50, n. 6p. 502–506. 2007.

BRANCH, R. A. Prevention of amphotericin B-induced renal impairment: A review on the use of sodium supplementation. **Arch. Intern. Med.**, 148: 2389-2394, 1988.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94 p. 223 – 253, 2004.

CÁCERES, A. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Guatemala: **Editorial Universitaria**, 1999. 402 p.

CARSON, C.F., MEE, B.J., RILEY, T.V. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 6, p. 1914 – 1920. 2002.

CATTALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistémicos. Farmacodinamia y farmacocinética. **Rev. Iberoam. Micol.**, v.23, p.39-49, 2006.

CHAMI, N. et al. A Study of anticandidal activity of carvacrol and eugenol in vitro and in vivo. **Oral Microbiol Immunol** v.20, n. 2, p.106–111, 2005.

CLEFF, M. B. et al. Isolation of candida spp from vaginal microbiota of healthy canine females during estrous cycle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 36, n. 2, p.201-204, 2007.

COLOMBO A, L. et al. High rate of non-*albicans* candidemia in Brazilian tertiary care hospitals. **Diagn Microbiol Infect Dis**. V.34, n.4, p.281-6, 1999.

COLOMBO, A. L. et al. Prospective observational study of candidemia in São Paulo, Brazil: incidence rate, epidemiology, and predictors of mortality. **Infect Control Hosp Epidemiol**. V.28, n.5, p.570-576, 2007.

COLOMBO, A. L.; et al. . Epidemiology of candidemia in Brazil: a nationwide sentinel surveillance of candidemia in Eleven Medical Centers. **J. Clin. Microbiol.**, v.44 n.8, p. 2816-2823, 2006.

CORREA-ROYERO, J. et al. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n.5, p.734-741, 2010.

COSENTINO, S. et al. *In-vitro* antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in Applied Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.

COSTA, E. O. et al. Survey of bovine mycotic mastitis in dairy herds in the State of São Paulo, Brazil. **Mycopathologia**. V.124, n. 1, p. 13-17, 1993.

COSTA, J. M. et al. Mastite por leveduras em bovinos leiteiros do Sul do Estado de Minas Gerais, Brasil. **Ciência Rural**.v.38, n.7, p.1938-1942, 2008.

- COSTA, G. M. et al. Effect of plant extracts on planktonic growth and biofilm of *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans*. **Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.** v.4, n. 6, p.908–917, 2015.
- COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.
- CRAVEIRO, A. A. et al. *Óleos Essenciais de Plantas do Nordeste*, Ed. UFC: Fortaleza, CE, 1981.
- CRAWSHAW, W. M.; MACDONALD, N. R; DUNCAN, G. Outbreak of *Candida rugosa* mastitis in a dairy herd after Intramammary antibiotic treatment. **Veterinary Record**. v.156, n.25, p.812-813, 2005.
- CRUZ, L. C. H. da. **Micologia Veterinária**. 2. ed. 348p. Rio de Janeiro: Revinter, 2010.
- DA MATTA, D. A. et al. Antifungal susceptibility of 1000 *Candida* bloodstream isolates to 5 antifungal drugs: results of a multicenter study conducted in São Paulo, Brazil, 1995-2003. **Diagn Microbiol Infect Dis**. V.57, n.4, p.399-404, 2007.
- DE ALMEIDA, L. F. D. et al. Efficacy of citronella and cinnamon essential oils on *Candida albicans* biofilms. **Acta Odontologica Scandinavica**, v. 74, n. 5, p. 393–398, 2016.
- DE MARIA, P. D. et al. Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. **Biotechnology Advances**. V.24, n.2, p.180– 196, 2006.
- DEANS, S. G; SUBOTA, K. P.; KENNEDY, A. I. Biological activity of plant volatile oils and their constituents. **Planta Med**. v.55, n.7, p.588, 1989.
- DERESINSKI, S. C.; STEVENS, D. A. Caspofungin. **Clin. Infect. Dis.**, v.36, p.1445-1457, 2003.
- DIGNANI, M. C. et al. **Clinical Mycology**, 1st edition. Philadelphia: Churchill Livingstone, 2003. Chap. 8.,p. 195-239.
- DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **J Appl Microbiol** v.88,p. 308–316, 2000.
- DROZDOWSKA, A. Morphological and biochemical features of fungi isolated from patients with renal failure. **Wiad Parazytol**. v.53, n.2, p.145-148, 2007.
- DUARTE, E. R. et al. Prevalence of yeasts and mycelial fungi in bovine parasitic otitis in the State of Minas Gerais, Brazil. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**, v.48, n.8, p.631-635, 2001.
- DUBE, M. P. et al. Fungemia and Colonization with Nystatin-Resistant *Candida rugosa* in a Burn Unit. **Clin Infect Dis**. v.18, n.1, p.77-82, 1994.

DUPONT, B. Overview of the lipid formulation of amphotericin B. **J. Antimicrob. Chemother.**, 49: 31-36, 2002.

EBANI, Valentina et al. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils against Pathogens Responsible for Otitis Externa in Dogs and Cats. **Medicines**, v. 4, n. 2, p. 21, 2017.

ELGAYYAR, M. et al. Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 7, p. 1019-1024, 2001.

ESPINEL-ENGROFF, A. et al. Multilaboratory Study of Epidemiological Cutoff Values for Detection of Resistance in Eight *Candida* Species to Fluconazole, Posaconazole,

FLEVARI, A. et Al. Treatment of invasive candidiasis in the elderly: a review. **Clinical Interventions in Aging**, v. 8, n., p. 1199-1208, 2013.

GALLO, M. G.; CABELI, P.; VIDOTTO, V. Presence of pathogenic yeasts in the feces of thesemi-domesticated pigeon (*Columba livia*, Gmelin 1789, urban type) from the city of Turin. **Parassitologia**. v. 31, n.2, p.207–212, 1989.

GIORDANI, R. ; REGLI, P.; KALOUSTIAN, J.; PORTUGAL, H. Potentiation of antifungal activity of amphotericin b by essential oil from *Cinnamomum cassia*. **Phytother Res.**, 20: 58- 61, 2006.

GIORGI, W. et al. Metrite purulenta em egua puro sangue ingles por *Candida rugosa*. **Revista de microbiologia**, v.17, n. 3. p.225-2277, 1986.

GONÇALVES, L. A. J. et al. Produção e composição do óleo essencial de Alfavaquinha (*Ocimum selloi Benth.*) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Rev. Bras. Pl. Med.**, 6: 8-14, 2003.

GONZÁLEZ, G. M.; ELIZONDO, M.; AYALA, J. Trends in species distribution and susceptibility of bloodstream isolates of *Candida* collected in Monterrey, Mexico, to seven antifungal agents: results of a 3-year (2004 to 2007) surveillance study. **J Clin Microbiol**. v.46, n.9, p.2902-2905, 2008.

GOODMAN, L. S; GILMAN, A. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw Hill, 9ª ed., p. 374, 1996.

GUBBINS, P. O.; ANAISSIE, E. Overview of antifungal agents. **Infect. Dis. Spec. Edit.**, 5: 65-70, 2002.

GUO, N. et al. Antifungal activity of thymol against clinical isolates of fluconazole-sensitive and -resistant *Candida albicans*. **J Med Microbiol**. v. 58, n.8, p.1074–1079, 2009.

HAMAL P, KOUKALOVÁ D. Yeasts in domestic animals: species identification and susceptibility to antifungals. **Klin Mikrobiol Infekc Lek**. v.16, n.1, p.4-9, 2010.

HANIF, M. A. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of unexplored *Omani basil*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.5, n.5, p.751-757, 2011.

HERNANDEZ, S. et al. Alternatives to amphotericin B for *Candida rugosa* infection. **Journal Antimicrob Chemother**. V. 4, n.2, p.477-80, 2004.

HOLLEY, R. A; PATEL, D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. **Food Microbiol** v. 22: p. 273-292, 2005.

HUDAIB, M.; SPERONI, E.; DI PIETRA, A.M.; CAVRINI, V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **J Pharm Biom Anal.**, 29: 691–700, 2002.

JOHNSON, M. D. et al. Combination antifungal therapy. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v.48, n.3, 693-715, 2004.

KANAFANI, Z.A.; PERFECT, J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clin. Infect. Dis.**, v.46, n.1, p.120-128, 2008.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, I. Antifungal activity of essential oils and their synergy with fluconazole against drug-resistant strains of *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum*. **Appl Microbiol Biotechnol**. v.90, n.3, p.1083-1094, 2011.

KRCMERY, V. et al. Nosocomial candidaemias due to species other than *Candida albicans* in cancer patients. Aetiology, risk factors, and outcome of 45 episodes within 10 years in a single cancer institution. **Support Care Cancer**. v.7, n.6, p.428-431, 1999.

KSOURI, S. et al. Survey of Bovine Mycotic Mastitis in Different Mammary Gland Statuses in Two North-Eastern Regions of Algeria. **Mycopathologia**. V.179, n.3, p.327-31, 2015.

KSOURI, S. et al. Antifungal activity of essential oils extract from *Origanum floribundum* Munby, *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus ciliatus* Desf. Against *Candida albicans* isolated from bovine clinical mastitis. **J Mycol Med**. V.27, n.2, p.245-249, 2017.

LACAZ, C. S. et al. **Tratado de Micologia médica**. São Paulo, 9ª ed., p. 123-169, 252-340, 616-635. Sarvier, 2002.

LAMBERT, R.J. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453 – 462, 2001.

LI, Y. et al. Asymptomatic oral yeast carriage and antifungal susceptibility profile of HIV-infected patients in Kunming, Yunnan Province of China. **BMC Infect Dis**. v.13, n.46, 2013.

LOEFFLER, J. et al. Phospholipid and sterol analysis of plasma membranes of azole-resistant *Candida albicans* strains. **FEMS Microbiology Letters**, v. 185, n. 1, p. 59- 63, 2000.

LORENZI, H; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MADHAVAN, P. et al. *In vitro* activity of fluconazole and voriconazole against clinical isolates of *Candida* spp. by E-test method. **Tropical Biomedicine**. V. 27, n.2, p.: 200–207, 2010.

MANGENA, T.; MUYIMA, N. Y. O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *Rosmarinus officinalis* on selected bacteria and yeast strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 291-296, 1999.

MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of origanum oil against *Candida Albicans*. **Mol Cell Biochem**. v.228, n.1-2, p.111-7, 2001.

MANZANO-GAYOSSO, P. et al. Candiduria in type 2 diabetes mellitus patients and its clinical significance. *Candida* spp. Antifungal susceptibility. **Rev. Med. Inst. Mex. Seguro Soc.**, 46: 603-610, 2008.

MARINO, M.; BERSANI, C.; COMI, G. Impedance measurements to study the antimicrobial activity of essential oils from *Lamiaceae* and *Compositae*. **Int J Food Microbiol.**, v.67, p. 3187– 3195, 2001.

MARTINS, A. et al. Essential oils from four Piper species. **Phytochemistry** v.49, p. 2019–2023, 1998.

MCDONALD, J S et al. In vitro antimycotic sensitivity of yeasts isolated from infected bovine mammary glands. **American journal of veterinary research**, v. 41, n. 12, p. 1987–90, 1980.

MEDINA, I. R. Pigeons and their droppings as reservoirs of *Candida* and other zoonotic yeasts. **Rev Iberoam Micol**. v.34, n.4, p.211-214, 2017.

MICELI, M. H.; KAUFFMAN, C. A. Isavuconazole: A New Broad-Spectrum Triazole Antifungal Agent. **Clin Infect Dis**. v.61, n.10, p.1558-1565, 2015.

MINCES, L. R. et al. *Candida rugosa*: a distinctive emerging cause of candidaemia. A case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis*. v.41, n.11-12, p.892-897, 2009.

MORETTI, A. et al. Isolation of *Candida rugosa* from Turkeys. **J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health**. v.47, n.6, p.433-439, 2000.

MORETTI, A., et al. Diffuse cutaneous candidiasis in a dog. Diagnosis by PCR-REA. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 21, p. 139–142, 2004.

MUELLER, R.S.; BETTENAY, S.V.; SHIPSTONE, M. Cutaneous Candidiasis in a dog, caused by *Candida guilliermondii*. **Vet. Rec.**, v.150, p.728-730, 2002.

NG, K. P. et al. *Candida* biotypes isolated from clinical specimens in Malaysia. **Mycopathologia**. v. 144, n. 3, p. 134-135, 1998.

NG, K. P. et al. Systemic *Candida* infection in University hospital 1997-1999: the distribution of *Candida* biotypes and antifungal susceptibility patterns. **Mycopathologia** v.149, n.3, p.141-6, 2001.

NIKOLIĆ, Miloš M. et al. Antimicrobial synergism and cytotoxic properties of Citrus limon L., Piper nigrum L. and Melaleuca alternifolia (Maiden and Betche) Cheel essential oils. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 69, n. 11, p. 1606–1614, 2017.

NUCCI, M, MARR, K. A. Emerging fungal diseases. **Clin Infect Dis** v.41, n.4, p.521-526, 2005.

ODDS, F.C.; NUFFEL, L.V.; DAMS, G. Prevalence of *C. dubliniensis* isolates in a yeast stock collection. **J. Clin. Microbiol.**, v. 36, p.2869-2873, 1998.

OOI, Linda S M et al. Antimicrobial activities of cinnamon oil and cinnamaldehyde from the Chinese medicinal herb *Cinnamomum cassia* Blume. **The American journal of Chinese medicine**, v. 34, n. 3, p. 511–522, 2006.

OPALCHENOVA, G.; OBRESHKOVA, D. Comparative studies on the activity of basil- an essential oil from *Ocimum basilicum* L. - against multidrug resistant clinical isolates of the genera *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Pseudomonas* by using different test methods. **Journal of Microbiological Methods**, v. 54, n. 1, p. 105-110, 2003.

OSTROSKY-ZEICHNER, L. et al. Multicenter retrospective development and validation of a clinical prediction rule for nosocomial invasive candidiasis in the intensive care setting. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis** v.26, p.271–276, 2007.

PAREDES, K. et al. Molecular Identification and Antifungal Susceptibility Testing of Clinical Isolates of the *Candida rugosa* Species Complex and Proposal of the New Species *Candida neorugosa*. **J Clin Microbiol**. v.50, n.7, p.2397-403.

PFALLER, M.A.; DIEKEMA, D.J. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.10, p.11-23, 2004.

PFALLER, M. A. et al. *Candida rugosa*, an Emerging Fungal Pathogen with Resistance to Azoles: Geographic and Temporal Trends from the ARTEMIS DISK Antifungal Surveillance Program. **J Clin Microbiol**. v.44, n.10, p.3578-3582, 2006.

PFALLER, M. A; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. **Clin Microbiol Rev**. v. 20, n.1, p.133-63, 2007.

PFALLER, M. A. et al. Results from the ARTEMIS DISK Global Antifungal Surveillance Study, 1997 to 2007: a 10.5-Year Analysis of Susceptibilities of *Candida* Species to Fluconazole and Voriconazole as Determined by CLSI Standardized Disk Diffusion. **J Clin Microbiol.** v.48, n.4, p.1366-1377, 2010.

PICCINELLI, A. C. et al. Anti-inflammatory and antihyperalgesic activities of ethanolic extract and fruticulina from *Salvia lachnostachys* leaves in mice. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** v. 2014, p.1–8, 2014.

PINA-VAZ, C. et al. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. **Journal of the European Academy of Dermatology & Venereology**, v.18, n.1, p. 73-78, 2004.

POZZATTI, P. et al. Inhibition de la formation de tube germinatif de *Candida albicans* et de *Candida dubliniensis* par diverses huiles essentielles. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 20, n. 3, p. 185–189, 2010.

POZZATTI, Patrícia et al. Comparison of the susceptibilities of clinical isolates of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to essential oils. **Mycoses**, v. 53, n. 1, p. 12–5, jan. 2009.

POZZATTI, Patrícia et al. In vitro activity of essential oils extracted from plants used as spices against fluconazole-resistant and fluconazole-susceptible *Candida* spp. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 11, p. 950–956, 2008.

PRESSLER, B.M. et al. *Candida* spp urinary tract infections in 13 dogs and seven cats: predisposing factors, treatment, and outcome. **Journal of the American Animal Hospital Association**, v.39, n.3 p.263-270, 2003.

QUEIROZ, P.A. et al. Adhesion and biofilm formation in artificial saliva and susceptibility of yeasts isolated from chronic kidney patients undergoing haemodialysis. **J Med Microbiol.** v.64, n.9, p.960-966, 2015.

REINHARDT, J. F., P. J. RUANE, L. J. WALKER, AND W. L. GEORGE. Intravenous catheter-associated fungemia due to *Candida rugosa*. **J. Clin. Microbiol.** v.22, n. 6 p.1056–1057, 1985.

REX, J. H.; et al. Antifungal susceptibility testing: practical aspects and current challenges. **Clin. Microbiol. Rev.** v.14, n. 4, p.643-658, 2001.

RIBEIRO, E. L. Leveduras de *Candida* isoladas da boca de crianças com Síndrome de Down: aspectos fenotípicos, relação intrafamiliar e perfil de imunoglobulinas. 2008. 129 f. Tese (Doutorado) – **Faculdade de Ciências da Saúde**, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

RICHARDSON, M. D.; WARNOCK, D.W. Fungal infection – Diagnosis and management, Blackwell Scientific Publications, London, Cap 3: **Antifungal drugs**, p.17-43, 1993.

RIPPON, J.W. Candidiasis and the pathogenic yeast. In: **Medical Mycology**. The pathogenic fungi and pathogenic actinomycetes. 3^a ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1988. p. 532- 581

SANCHIS, M. et al. Efficacy of echinocandins against murine infections by *Candida (Candida) rugosa*. **Diagn Microbiol Infect Dis**. v.86, n.1, P.:61-65, 2016.

SANTOS, R. C.; MARIN, J. M. Isolation of *Candida* spp. From mastitic bovine milk in Brazil **Mycopathologia**, v.159, n.2 p. 251-253, 2005.

SARER, E.; PANCALI, S.; YILDIZ, S. Chemical composition and antimicrobial composition of essential oil of *Origanum minutiflorum*. **J Fac Pharm Ankara** v.25, p. 29-38, 1996.

SCACCABAROZZI, L. et al. Epidemiology and genotyping of *Candida rugose* strains responsible for persistent intramammary infections in dairy cows. **J. Dairy Science**. V.94, n.9, p. 4574–4577, 2011.

SCHAECHTER, M. **Desk Encyclopedia of Microbiology**. 2 ed. San Diego: Academic Press, p. 1276, 2009.

SEKER, E. Identification of *Candida* Species Isolated from Bovine Mastitic Milk and Their In Vitro Hemolytic Activity in Western Turkey. **Mycopathologia**. V.169, N.4, P.303-8, 2010.

SERRACARBASSA, P.D., DOTTO, P. Endofitalmite por *Candida albicans*. **Arquivos Brasileiro de Oftalmologia**. v.66, p.701-707,2003.

SHREAZ, S. et al. Spice oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. **Fitoterapia**, v.82, n.7, p.1012-1020, 2011.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F .G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 338p, 2004.

SIMÕES, C. M. O. (organizador) *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 1999.

SINGH, R. I. et al. Epidemiology of candidaemia in critically ill trauma patients: experiences of a level I trauma centre in North India. **J Med Microbiol**. v.60,. n.3, p.342-348, 2011.

SIVROPOULOU, A. et al. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 1202-1205, 1996.

SOLIMAN, K. M.; BADEAA, R. I. Effect of oil extracted from some medicinal plants on different mycotoxigenic fungi. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 11, p. 1669-1675, 2002.

SOUZA, M. P. et al. **Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras**. Fortaleza: Edições UFC/Laboratório de Produtos Naturais, 1991.

SOUZA, R.C. et al. Comparison of the photodynamic fungicidal efficacy of methylene blue, toluidine blue, malachite green and low-power laser irradiation alone against *Candida albicans*. **Laser Medical Science**, v.25, n.3, p.385-389, 2010.

SPINOSA, H. S.; GÓRNIK, S. L.; BERNARDI, M. M. **Farmacologia Aplicada a Medicina Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2ª ed., v.1, 752 p., 2002.

SUGAR, A. M.; STEVENS, D. A. *Candida rugosa* in Immunocompromised Infection: Case Reports, Drug Susceptibility, and Review of the Literature. **Cancer**, v. 56, n.2, p. 318-320, 1985.

SUZUKI, L. C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. 2009. 48f. Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Materias)- **Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo**, 2009.

TAK, V. et al. The Epidemiological Profile of Candidemia at an Indian Trauma Care Center. **J Lab Physicians**. v.6, n.2, p.96-101, 2014.

TAMPIERI, M. P. et al. The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. **Mycopathologia**, v. 159, n. 3, p. 339-345, 2005.

TEN CATE, J.M. et al. Molecular and cellular mechanisms that lead to *Candida* biofilm formation. **J. Dent. Res.**, v.88, n. 2, p.105-115, 2009.

TERÇARIOLI, G. R. **Comparação genotípica e fenotípica de diferentes isolados clínicos de colonização e candidemia por *Candida rugosa***. 2009. 150p. Dissertação. (Programa de Pós Graduação em Infectologia). Universidade Federal de São Paulo. São Paulo, SP. 2009.

TIAN, H.; LAI, D. M. Analysis on the volatile oil in *Origanum vulgare*. **Journal Chinese Medicinal materials**, v.29, n.9, p.920–921, 2006.

TRICK, W. E.; et al. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989-1999. **Clinical Infectious Disease**. v.35, n.5, p.627-630, 2002.

TOMIZUKA, N; OTA, Y.; YAMADA, K. Studies on lipase from *Candida cylindracea*: Part I. Purification and properties. **Agric Biol Chem** v.30, n.6, p.576 –584, 1996.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Appl Environ Microbiol**. v.68, n.4, p.1561–1568, 2002.

UNAL, A. et al. Fungal peritonitis in peritoneal dialysis: an analysis of 21 cases. **Int Urol Nephrol**. v.43, n.1, p.211-213, 2011.

VIDOTTO, V., GALLO, M. G. Study on the presence of yeasts in the feces of the rock pigeon (*Columba livia*, Gmelin 1789) from rural areas. **Parassitologia**.v. 2, n. p.313–20, 1985.

VITAL, M. J. S. et al. Mycotoxigenic yeasts isolated from Amazon soils of the Maracá ecological station, Roraima-Brazil. **Braz. J. Microbiol.** v.33, n.3, p.230-235, 2002.

VOKOU, D.; KOKKIMI, S.; BESSIERE, J. M. *Origanum onites* (Lamiaceae) in Greece: distribution, volatile oil yield and composition. **Economic Botany**, v.42, n.3, p.402-412, 1988.

WEBSTER, J. R.; WEBER, W. S. **Introduction to Fungi**. New York: Cambridge University Press, 3^a ed., 855p., 2007.

WINGETER, M. A. et al. Identificação microbiológica e sensibilidade in vitro de *Candida* isoladas da cavidade oral de indivíduos HIV positivos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.40, n.3, p.272-276, 2007.

ZHOU, Y. et al. Survey of mycotic mastitis in dairy cows from Heilongjiang Province, China. **Tropical Animal and Health Production**. V. 45, n.8, p :1709-14, 2013.