

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

Vitor Corteline Roos

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTIBIOFILME E ANTIOXIDANTE DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus deliciosa* Tenore**

Santa Maria, RS
2020

Vitor Corteline Roos

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTIBIOFILME E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Citrus deliciosa* Tenore**

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

Orientador: Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Amanda Leitão Gindri

Santa Maria, RS
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Roos, Vitor Corteline
Atividade antifúngica, antiobiofilme e antioxidante
do óleo essencial de Citrus deliciosa Tenore / Vitor
Corteline Roos.- 2020.
79 p.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientadora: Amanda Leitão Gindri
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2020

1. Atividade antimicrobiana 2. Bergamota 3. N-metil
antranilato de metila 4. Toxicidade 5. Rutaceae I.
Vianna Santos, Roberto Christ II. Leitão Gindri, Amanda
III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, VITOR CORTELINE ROOS, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Vitor Corteline Roos

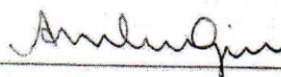
**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTIBIOFILME E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO
ESSENCIAL DE *Citrus deliciosa* Tenore**

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

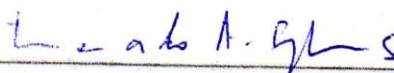
Aprovado em 22 de junho de 2020:



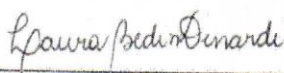
Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)
(Orientador)



Amanda Leitão Gindri, Dra. (URI)
(Co-orientadora)



Bernardo Almeida Iglesias, Dr. (UFSM) – Parecer



Laura Bedin Denardi, Dra. (UFSM) – Parecer

Santa Maria, RS
2020

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus familiares, especialmente à minha mãe Ila Corteline Roos (*In memoriam*), a qual sempre me deu incentivo e força para alcançar meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer um dos principais responsáveis pela realização desse trabalho, meu orientador, Prof. Dr. Roberto Christ Vianna Santos. Obrigado pela oportunidade de ingresso no seu grupo de pesquisa, pelo apoio, amizade e ensinamentos.

Agradeço também à minha coorientadora, Prof. Dra Amanda Leitão Gindri, obrigado pelo incentivo desde a época de graduação e pela colaboração na realização do presente trabalho.

Agradeço a minha família, por ser meu alicerce e pelo apoio para a realização desse sonho.

Obrigado aos colegas de laboratório do LAPEMICRO, pela ajuda, companheirismo e por deixar nossos dias de trabalhos mais leves e divertidos.

Agradeço aos laboratórios parceiros, pela ajuda e por tornar a realização desse trabalho viável. Meu muito obrigado ao:

-Laboratório de Farmacognosia da URI-Santiago, especialmente à Patrícia Pacheco e a Prof. Amanda Gindri;

-Laboratório de caracterização, especialmente ao Prof. Roger Wagner e a Ingrid Duarte;

-LAPEMI, especialmente à Laura Denardi e ao Prof. Sydney Alves;

-E ao grupo de pesquisa da Prof. Micheli Sagrilo da Universidade Franciscana.

RESUMO

ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTIBIOFILME E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Citrus deliciosa* Tenore

AUTOR: Vitor Corteline Roos
ORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos
Coorientadora: Amanda Leitão Gindri

As plantas e seus metabólitos são utilizados há anos na medicina popular para o tratamento de diversas doenças. Neste contexto, os óleos essenciais derivados de plantas são substâncias voláteis, lipofílicas e aromáticas, apresentando diversas propriedades terapêuticas, as quais têm sido extensivamente exploradas. As doenças infecciosas, bem como outras doenças que envolvem o aumento na produção de radicais livres vêm preocupando a população progressivamente. Especialmente devido à gravidade dessas doenças, e as poucas opções terapêuticas, estudos com substâncias naturais surgem como nova alternativa para o tratamento dessas enfermidades. Diante do exposto, este trabalho teve como objetivo avaliar a composição química, atividade antifúngica, antibiofilme e antioxidante e a toxicidade, bem como o rendimento do óleo essencial de bergamota (*Citrus deliciosa* Tenore). As folhas de *C. deliciosa* Ten. foram coletadas em São Francisco de Assis-RS, secas e submetidas ao processo de hidrodestilação para obtenção do óleo essencial. A composição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa. A atividade antifúngica frente a leveduras foi realizada através da metodologia de microdiluição em caldo e a atividade antioxidante pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e FRAP (poder de redução do íon ferro). A análise da atividade antibiofilme foi realizada através do método do cristal violeta. A citotoxicidade foi avaliada pela metodologia do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio). A extração do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. obteve um rendimento de 0,97% ± 0,04. O perfil cromatográfico do óleo essencial revelou 12 substâncias (perfazendo 100% da composição do óleo), sendo *N*-metil-antranilato de metila (75,1%), γ -terpineno (13,8%) e dl-Limoneno (7%) as substâncias majoritárias. O óleo de *C. deliciosa* apresentou ação antifúngica contra todas as leveduras testadas, com promissora ação frente *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Trichosporon asahii*. Esse composto também foi capaz de inibir a produção de biofilme de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *T. asahii*. Em biofilmes maduros, o óleo essencial de *C. deliciosa* reduziu a biomassa do biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*. O óleo essencial de bergamota apresentou fraca ação antioxidante. O mesmo não apresentou citotoxicidade em células mononucleares humanas nas concentrações testadas. Almeja-se que estes resultados possam nortear futuros estudos para a produção de formulações que possam ser utilizadas no tratamento de biofilmes causados por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. asahii*, como também na candidíase, criptococose e/ou tricosporonose.

Palavras-chave: Atividade antimicrobiana. Bergamota. *N*-metil-antranilato de metila. Toxicidade. Rutaceae.

ABSTRACT

ANTIFUNGAL, ANTIBIOFILM AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Citrus deliciosa* Tenore

AUTHOR: VITOR CORTELINE ROOS
ADVISOR: Roberto Christ Vianna Santos
CO-SUPERVISOR: Amanda Leitão Gindri

Plants and their metabolites have been used in folk medicine for years to treat various diseases. Plant essential oils are volatile, lipophilic, and aromatic substances, presenting several therapeutic properties, which have been extensively explored. Infectious diseases, as well as other diseases that involve an increase in the production of free radicals, have been increasingly worrying about the population. Especially due to the severity of these diseases, and the few therapeutic options, studies with natural substances appear as a new alternative for the treatment of these diseases. Given the above, this study aimed to evaluate the chemical composition, antifungal activity, antibiofilm, and antioxidant and toxicity, as well as the yield of essential oil of bergamot (*Citrus deliciosa* Tenore). The leaves of *C. deliciosa* Ten. were collected in São Francisco de Assis-RS, dried, and submitted to the hydrodistillation process to obtain the essential oil. The chemical composition of the essential oil was determined by gas chromatography. The antifungal activity against yeasts was carried out using the broth microdilution methodology and the antioxidant activity by the method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazil) and FRAP (iron ion reduction power). The analysis of antibiofilm activity was performed using the violet crystal method. Cytotoxicity was assessed using the MTT methodology (3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide). The extraction of the essential oil of *C. deliciosa* Ten. obtained a yield of 0.97% ± 0.04. The chromatographic profile of the essential oil revealed 12 substances (making up 100% of the oil composition), being methyl N-methyl anthranilate (75.1%), γ -terpinene (13.8%) and dl-Limonene (7%) the majority substances. The oil of *C. deliciosa* had antifungal action against all tested yeasts, with promising action against *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii*, and *Trichosporon asahii*. This compound was also able to inhibit the biofilm production of *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, and *T. asahii*. In mature biofilms, the essential oil of *C. deliciosa* reduced the biomass of the biofilm of *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*. The essential oil of bergamot showed weak antioxidant action. It did not show cytotoxicity in human mononuclear cells at the concentrations tested. It is hoped that these results may guide future studies to produce formulations of formulations that can be used in the treatment of biofilms caused by *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, and *T. asahii*, as well as in candidiasis, cryptococcosis and/or trichosporonosis.

Keywords: Antimicrobial activity. Bergamot. Methyl N-methyl anthranilate. Toxicity. Rutaceae.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Espécie <i>C. deliciosa</i> Ten.....	15
Figura 2 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>C. deliciosa</i> Ten.	39
Figura 3 - Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de <i>C. deliciosa</i> Ten	40
Figura 4 - Atividade inibitória do OE de <i>C. deliciosa</i> Ten. frente biofilmes de <i>Candida</i> spp. e <i>T. asahii</i>	44
Figura 5 - Atividade do OE de <i>C. deliciosa</i> Ten. frente biofilmes de <i>Candida</i> spp. e <i>T. asahii</i>	46
Figura 6 - Avaliação da viabilidade celular por MTT do óleo essencial de <i>C. deliciosa</i> Ten.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Constituição química do óleo essencial das folhas de <i>C. deliciosa</i> Ten. ...	38
Tabela 2- Atividade antimicrobiana do óleo essencial de bergamota.	40
Tabela 3 - Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>C. deliciosa</i>	48

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	13
2.1	OBJETIVO GERAL.....	13
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	13
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	14
3.1.1	Gênero <i>Citrus</i>	14
3.1.2	Espécie <i>Citrus deliciosa</i> Tenore	15
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	16
3.3	ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	17
3.4	INFECÇÕES FÚNGICAS	18
3.4.1	Gênero <i>Cryptococcus</i> e a criptococose	20
3.4.2	<i>Trichosporon asahii</i> e a tricosporonose	22
3.4.3	Gênero <i>Candida</i> e a candidíase	23
3.5	BIOFILMES	25
3.6	FÁRMACOS DISPONÍVEIS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR <i>Candida</i> spp., <i>Cryptococcus</i> spp., E <i>Trichosporon asahii</i> E OS PROBLEMAS DESSA TERAPIA.....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	MATERIAL VEGETAL	31
4.2	OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E AVALIAÇÃO DE SEU RENDIMENTO.	31
4.3	ANÁLISE CROMATOGRÁFICA	31
4.4	ENSAIOS DE SUSCETIBILIDADE	32
4.4.1	Microrganismos	32
4.4.2	Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	33
4.4.3	Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)	33
4.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE <i>C. deliciosa</i> Ten.	34
4.5.1	Ensaio de inibição da formação de biofilme	34
4.5.2	Ensaio de erradicação de biofilme	34
4.5.3	Quantificação da biomassa do biofilme	35
4.6	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE <i>C. deliciosa</i> Ten ...	35
4.6.1	Capacidade da captura do radical DPPH (2,2, difenil-2-picrilhidrazil) ...	35
4.6.2	Poder de redução do ferro (FRAP)	36
4.7	AVALIAÇÃO DA CITOXICIDADE DE <i>C. deliciosa</i> Ten	36
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
5.1	RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. deliciosa</i>	38
6.2	ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	40
6.3	ATIVIDADE ANTIBIOFILME	44

6.4	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	48
6.5	CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>C. deliciosa</i>	49
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UNIVERSIDADE FRANCISCANA	77

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais derivados da flora são utilizados pela população com finalidade terapêutica desde a antiguidade. Sabe-se que as plantas medicinais possuem em sua constituição compostos com atividade biológica (metabólitos secundários), que auxiliam na cura e no tratamento de várias doenças (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007; FIRMO et al., 2011).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários que podem ser obtidos de diferentes plantas aromáticas. Geralmente são líquidos, lipofílicos, voláteis e apresentam aroma específico (KALEMBA; KUNICKA, 2003; BAKKALI et al., 2008). A constituição química destes compostos é complexa, na maioria das vezes possuem na sua constituição fenilpropanoides, monoterpenos e sesquiterpenos, os quais são responsáveis pelas propriedades organolépticas e terapêuticas dos óleos essenciais (MIRANDA et al., 2016; OLIVEIRA, 2012).

Já foram relatadas cientificamente várias propriedades biológicas dos óleos essenciais de diversas plantas, onde pode se destacar: atividade antimicrobiana, antioxidante, antiviral, analgésica, cicatrizante, anti-inflamatória, expectorante, antisséptica, larvicida, relaxante, antiespasmódica, dentre outras (HALCON; MILKUS, 2004; COSTA et al., 2005; LIMA et al., 2006; OYEDJI; AFOLAYAN, 2006; MIGUEL, 2010). Devido ao grande número de propriedades destes compostos, vários estudos buscam, neste sentido, elucidar possíveis ações de diferentes óleos essenciais (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Dentre diversos gêneros, o gênero *Citrus* (Rutaceae) faz parte das plantas medicinais aromáticas (BAKKALI et al., 2008; GUIMARÃES et al., 2010). As plantas que fazem parte desse gênero são utilizadas popularmente como anti-inflamatórias, bactericidas, bem como para o tratamento da gripe e da tosse. Estudos sobre as propriedades farmacológicas desse gênero elucidaram diversas ações, tais como: sedativas, antialérgicas, antioxidantes, antimicrobianas, entre outras (VENDRUSCOLO; RATES; MENTZ, 2005; CAMPELO et al., 2013; PRUDENTE; MOURA, 2013; SANTOS et al., 2016).

Pertencendo a este gênero, a espécie *Citrus deliciosa* Tenore é conhecida popularmente como bergamota ou mexerica, e suas folhas são utilizadas na cultura popular para o tratamento de gripes e resfriados (CASAGRANDE, 2009; BRITO; SENNA-VALLE, 2011; ROOS et al., 2019). Além disso, é comprovada ação

antimicrobiana de óleos essenciais de *Citrus deliciosa*, combatendo assim as infecções (TONELLI; GEROMEL; FAZIO, 2018).

As doenças infecciosas fúngicas, especialmente as causadas por leveduras oportunistas vem preocupando a saúde da população mundial, fato esse relacionado à grande resistência desses microrganismos a terapia antifúngica, bem como as reações alérgicas e toxicidade que a mesma causa. Considerados forma de resistência, os biofilmes são definidos como uma comunidade de microrganismos estruturados em matrizes extracelulares poliméricas, onde os quais podem estar aderidos a diversas superfícies (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). A formação de biofilme fúngico, como o causado por *Candida spp.* e *Trichosporon asahii* acaba dificultando o tratamento e colabora principalmente com o aumento da resistência aos medicamentos antifúngicos mais utilizados (DI BONAVENTURA et al., 2006; CHAVANT et al., 2007; SUN et al., 2012).

Paralelo ao processo infeccioso ocorre à ativação do sistema imune, o que acarreta em resposta inflamatória, isso envolve células de defesa, citocinas e conseqüentemente aumento da oxidação celular através da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (AGITA; THAHA, 2017). As substâncias oxidantes e os radicais livres estão envolvidos em diversas doenças crônicas e degenerativas que afetam o organismo humano, dentre elas podemos citar o câncer, Alzheimer, diabetes, aterosclerose, doenças vasculares, bem como envelhecimento (SOUSA et al., 2007). Devido à agressividade dessas doenças, vários estudos têm sido realizados para determinar a eficácia dos óleos essenciais em inibir ou reduzir a ação dos radicais livres (MIRANDA, 2010).

Devido aos escassos estudos envolvendo o óleo essencial das folhas de bergamota, bem como o aumento da resistência dos microrganismos aos medicamentos atuais e os efeitos indesejáveis e toxicidade que os mesmos causam, e ainda devido à grande incidência de doenças envolvendo radicais livres, este trabalho objetiva investigar a composição química, atividade antifúngica, antibiofilme, antioxidante, citotoxicidade, bem como o rendimento do óleo essencial de bergamota.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a composição química, atividade antifúngica, antibiofilme e antioxidante do óleo essencial obtido das folhas de *Citrus deliciosa* Tenore, além de sua toxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extrair e determinar o rendimento do óleo essencial das folhas de *C. deliciosa* Ten.;
- Identificar a composição química do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten.;
- Avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. frente *Candida* spp., *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Trichosporon asahii*;
- Investigar a atividade antibiofilme do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. frente à *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Trichosporon asahii*;
- Avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial;
- Determinar *in vitro* a citotoxicidade do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

O Brasil está entre os quatros grandes produtores mundiais de óleos essenciais, juntamente com China, Indonésia e Índia (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Estes produtos são utilizados em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, alimentícia, agrícola, cosmética, entre outras (MORAIS, 2009).

Os óleos essenciais caracterizam-se por serem extratos de plantas aromáticos, com aspecto oleoso e de caráter volátil (BURT, 2004). Eles fazem parte do metabolismo secundário dos vegetais, tendo função de proteção contra predadores, perda de água e aumento de temperatura, bem como adaptação ao meio ambiente, atração de polinizadores e inibição da germinação (SIMÕES et al., 2010; FERESIN et. al., 2001; OKOH, 2010).

Estes compostos podem ser extraídos de diversas partes das plantas, como folhas, flores, frutos, sementes, caules e raízes (ASBAHANI et al., 2015). A composição química e o rendimento dos óleos essenciais podem variar de acordo com a parte da planta, com a genética, clima, localização, época de coleta e também com o método de extração utilizado, sendo que estes fatores podem influenciar diretamente nas propriedades biológicas dos mesmos (CIOLFI, 2010; RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A constituição química dos óleos essenciais é variada e pode apresentar um grande número de substâncias. Os óleos essenciais possuem compostos majoritários e componentes traços que juntamente ou isoladamente, são responsáveis pelas atividades biológicas (DAFERERA; ZIOGAS; POLISSIOI, 2003; SILVA; BASTOS, 2007).

Os óleos essenciais extraídos das plantas cítricas são utilizados como matérias-primas nas indústrias de perfumaria, cosmética, farmacêutica, alimentícia e de polímeros (SILVA-SANTOS & ANTUNES, 2007). As espécies de *Citrus* possuem frutos, folhas e flores bem aromáticas, devido a isso diferentes espécies desse gênero são utilizadas na extração de óleos essenciais (ARAÚJO JÚNIOR, 2009).

3.1.1 Gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* é originário do sudeste asiático e pertence à família Rutaceae, a qual possui 156 gêneros e 1800 espécies. É constituída de gêneros aromáticos que possuem óleos essenciais localizados em regiões temperadas e tropicais do mundo (DUGO; DI GIACOMO, 2002; PERVEEN; QAISER, 2005; COSTA et al., 2010). As folhas, flores e frutos desse gênero apresentam abundante aroma e os óleos essenciais são produzidos em maior quantidade nas folhas e nas cascas dos frutos (ARAÚJO JÚNIOR, 2009; ELLOUZE et al., 2012).

Entre algumas espécies que se destacam, temos *Citrus sinensis* (Laranja), *Citrus paradisi* (Toranja), tangerineiras (diversas espécies), *Citrus limon* (Limão), *Citrus aurantifolia* (Lima), *Citrus deliciosa* e dentre outras (SAIDANI; DHIFI; MARZOUK, 2004; PEREIRA, 2008).

3.1.2 Espécie *Citrus deliciosa* Tenore

A planta *C. deliciosa* (Figura 1) é conhecida popularmente no estado do Rio Grande do sul como bergamota e nas demais regiões do Brasil como tangerina ou mexerica (GRINGS, 2004). O cultivo dessa espécie se destaca na região sul do Brasil, sendo uma importante fonte de renda e de recursos econômicos (FRIZZO; LORENZO; DELLACASSA, 2004).

Figura 1 - Espécie *C. deliciosa* Ten.



Fonte: (O autor, 2020).

Essa espécie caracteriza-se por apresentar médio porte, ramos finos e com poucos espinhos, folhas pequenas, lanceoladas e alongadas, com odor característico. Seus frutos possuem tamanho médio, são achatados nas extremidades, com várias sementes poliembrionicas e com casca mole e fina (HODGSON, 1967).

A constituição química do óleo essencial das folhas de *C. deliciosa* mostra como substâncias majoritárias o *N*-metil-antranilato de metila, γ -terpineno e limoneno (ALMEIDA, 2013). Cabe ressaltar que até o momento estudos sobre sua composição química e atividades farmacológicas são escassos.

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

As plantas e seus compostos, especialmente os óleos essenciais, são utilizados na medicina popular há vários anos (NASCIMENTO et al., 2007). Sabe-se também, que estes compostos atuam na defesa das plantas contra microrganismos, sendo considerados os compostos antimicrobianos mais importantes localizados nas espécies vegetais (SIQUI et al., 2000; MACHADO; BORGES; BRUNO, 2011).

A procura de novos agentes antimicrobianos por meio de produtos de origem vegetal se justifica pelo baixo custo, por servir de alternativa a infecções resistentes a antimicrobianos convencionais e por estarem disponíveis na natureza (CAVALCANTI; ALMEIDA; PADILHA, 2011).

Os óleos essenciais possuem atividade antimicrobiana comprovada frente a diversos microrganismos, tais como bactérias, leveduras e fungos filamentosos (CACCIONI et al., 1998; PRASHAR et al., 2003). Estevam (2017) testou os óleos essenciais extraídos das folhas de *Citrus limonia* e *Citrus latifolia* frente às bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis*. Os resultados indicaram que tanto *C. limonia* e *C. latifolia* apresentaram atividade antibacteriana moderada frente às bactérias citadas (ESTEVAM, 2017). Tao et al., (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus reticulata* Blanco. Os resultados demonstraram que o mesmo apresentou atividade sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Aspergillus flavus* e *Bacillus subtilis* (TAO et al., 2009).

CASTRO e LIMA (2011) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*. O óleo apresentou atividade frente à *C. albicans* e

Candida tropicalis, tendo Concentração inibitória mínima (CIM) de 312,5 µg/mL para ambos os microrganismos (CASTRO; LIMA, 2011). Nakamura et al (2004) testaram o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* frente *C. albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Este composto apresentou atividade antifúngica frente a todas as espécies de *Candida* acima citadas (NAKAMURA et al. 2004).

Outro estudo realizado com óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Cyperus aromaticus*, *Mentha x villosa* e *Lippia sidoides* demonstrou atividade antifúngica destas plantas contra *Trichosporon asahii* (PONTES et al., 2004). Fernandez-Andrade e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Laurus nobilis* contra *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*, neste ensaio o óleo essencial apresentou boa ação frente a esses microrganismos (FERNANDEZ-ANDRADE et al., 2016).

Existem poucos estudos da atividade antimicrobiana de *C. deliciosa*. Algumas pesquisas realizadas com o óleo essencial das cascas dos frutos dessa espécie demonstraram atividade frente *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* e *Sclerotinia sclerotiorum* (CACCIONI et al., 1998; DIAS et al., 2019). Já o óleo essencial obtido das folhas de *C. deliciosa* apresentou ação contra *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (TONELLI; GEROMEL; FAZIO, 2018). Cabe destacar que o presente trabalho é um dos primeiros a avaliar a ação antifúngica de *C. deliciosa* frente *Candida* spp., *T. asahii*, *C. gattii* e *C. neoformans*.

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Com a descoberta dos efeitos nocivos dos radicais livres no corpo humano, como o possível desenvolvimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer, a busca por novos compostos antioxidantes se intensificou (BARBOSA et al., 2010; GOMES, 2014). Os óleos essenciais possuem funções biológicas diversificadas, entre elas a defesa contra processos oxidativos (BURT, 2004; SINGH et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

A utilização de antioxidantes sintéticos nos alimentos também motiva a busca de novos antioxidantes naturais, pois pesquisas com aditivos sintéticos relataram possíveis efeitos carcinogênicos (GUILLARD et al., 2009; ANDRADE et al., 2012).

Sabe-se que a conservação dos alimentos industrializados depende do bloqueio da oxidação, pois esse processo causa deterioração nos alimentos, promovendo mudanças nas características organolépticas e formação de substâncias tóxicas (HUSSEIN et al., 2013).

Os produtos de origem natural, especialmente os óleos essenciais surgem como alternativa para o controle dos processos oxidativos. Scherer et al., (2009) avaliaram a atividade antioxidante pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) dos óleos essenciais de *Caryophyllus aromaticus*, *Cymbopogon winterianus*, e pronunciada ação antioxidante foi visualizada pelo óleo essencial de *C. aromaticus* L., já o óleo de *C. winterianus* apresentou atividade antioxidante fraca (SCHERER et al., 2009).

Também utilizando a metodologia do DPPH, Santos et al (2016) avaliaram a ação antioxidante do óleo essencial extraído das cascas de *Citrus aurantium* e das sementes de *Passiflora edulis*. Atividade antioxidante moderada foi demonstrada por *C. aurantium* e *P. edulis* (SANTOS et al., 2016). PATIL e colaboradores (2010) avaliaram a ação antioxidante através do poder de redução do ferro (FRAP) do óleo essencial de *Ageratum conyzoides*, o mesmo apresentou boa ação antioxidante. Estes estudos reafirmam que os produtos naturais podem apresentar ação antioxidante.

3.4 INFECÇÕES FÚNGICAS

As doenças fúngicas podem ser ocasionadas por microrganismos saprófitas (vivem em material orgânico em decomposição), simbiontes (vivem em associação), comensais (habitam outros organismos, onde se beneficiam sem prejudicar ou promover benefícios ao outro), parasitas (habitam um hospedeiro se beneficiando, podendo trazer prejuízos a ele) e organismos aclorofilados, os quais podem causar infecções que variam de superficiais a sistêmicas graves (LACAZ et al., 2002; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

A incidência das infecções fúngicas tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas, elas estão em quarto lugar como causadoras de sepse adquirida em hospitais, ficando entre 5% a 10% dos casos (WISPLINGHOFF et al., 2014). Um fator que contribui para o aumento dessa incidência é o aumento no número de pacientes imunocomprometidos, como portadores da síndrome da imunodeficiência

adquirida (SIDA), transplantados, neutropênicos e pacientes com câncer ou que fazem uso de medicamentos imunossupressores (WARNOCK, 2007).

Os fungos que causam infecções em humanos são classificados como patógenos primários (afetam hospedeiros imunocompetentes) e patógenos oportunistas (afetam pacientes imunodeprimidos), os quais podem causar infecções superficiais, cutâneas, subcutâneas e até mesmo sistêmicas ou profundas (LAZÉRA et al., 2013).

As infecções superficiais afetam as camadas mais externas da pele e das mucosas e não possuem caráter invasivo, como a pitiríase versicolor causada por fungos do gênero *Malassezia* (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Já as infecções cutâneas possuem caráter sintomático e afetam as unhas, pelos e as camadas mais internas da epiderme e das mucosas, como as leveduras do gênero *Candida* e do gênero *Trichosporon* (MADHAVAN et al., 2011; OLIVEIRA, 2012).

As infecções subcutâneas acometem as camadas mais profundas da pele, como a derme, tecidos conjuntivos e músculos. Geralmente os microrganismos penetram nos tecidos através de inoculação traumática, levando à formação de abscessos, úlceras que não cicatrizam e fístulas que drenam material seropurulento. Dentre as principais doenças subcutâneas podemos destacar os micetomas, a esporotricose e a cromoblastomicose (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009).

Já as infecções sistêmicas são ocasionadas após a inalação de propágulos fúngicos, onde os microrganismos se disseminam pela via sanguínea, podendo afetar diversos órgãos, este tipo de infecção ocorre principalmente em pacientes com algum tipo de deficiência no sistema imune (QUINDÓS, 2014). Estas infecções são de difícil tratamento e causam elevadas taxas de mortalidade e morbidade (MONTAGNA et al., 2013; PARAMYTHIOTOU et al., 2014; WISPLINGHOFF et al., 2014). Entre as principais podemos destacar a histoplasmose, blastomicose, esporotricose, coccidioidomicose, bem como a criptococose causada pelo *Cryptococcus gattii* (LAZÉRA et al., 2013; BROOKS et al., 2010; GIOLO; SVIDZINSKI, 2010).

Outro tipo de infecção fúngica que possui alta taxa de mortalidade e morbidade são as consideradas oportunistas, apesar de apresentar-se em baixa frequência quando comparada as infecções bacterianas causam grande preocupação (AYATS et al., 2010). Os agentes causadores de infecções oportunistas infectam pacientes imunossuprimidos e dependendo da via de entrada

podem causar infecções que variam de cutâneas a sistêmicas invasivas e fatais (EGGIMANN; GARBINO; PITTET, 2003; LAZÉRA et al., 2013). Estas podem ser transmitidas no ambiente hospitalar por objetos contaminados ou por transmissão nosocomial, mas na maioria das vezes a origem desse tipo de infecção é a autocontaminação através dos microrganismos que habitam a microbiota normal desses pacientes (PFALLER; DIEKEMA, 2010; ALANGADEN, 2011). Entre os microrganismos que causam este tipo de infecção estão os do gênero *Candida*, *Cryptococcus* e *Trichosporon* (LAZÉRA et al., 2013; MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009; LEMES et al., 2010).

3.4.1 Gênero *Cryptococcus* e a criptococose

O gênero *Cryptococcus* atualmente possui cerca de 70 espécies, sendo constituído de leveduras encapsuladas de forma esféricas ou globosas (KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são as principais causadoras da infecção por *Cryptococcus* em humanos (criptococose), porém com menor incidência outras espécies como *C. albidus*, *C. laurentii* e *C. curvatus* também podem ocasionar infecções (PFALLER; MCGGINNIS; ANAISSIE, 2009).

A criptococose é uma doença infecciosa com distribuição mundial que apresenta diferentes tipos de manifestações clínicas (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Essa doença acomete com maior incidência o sistema nervoso central e/ou o pulmão, sendo a meningoencefalite a manifestação clínica mais comum, estando presente entre 70 a 90% dos casos (SATISHCHANDRA et al., 2007; GOLDMAN; VOLLMER; LUKS, 2010). As taxas de mortalidade podem chegar a 20%, mesmo em pacientes que estão fazendo uso de antifúngicos (OLIVEIRA, 2016).

A infecção ocorre pela inalação dos propágulos fúngicos, os quais atingem os alvéolos pulmonares e se instalam no pulmão, podendo ser eliminados pelo sistema imune ou causar a criptococose pulmonar (infecção primária), levando a pneumonia, febre, dor no peito ou não causar nenhum sintoma (CHAYAKULKEEREE; PERFECT, 2006; GILES et al., 2009). Caso a imunidade estiver comprometida o fungo pode disseminar-se pela corrente sanguínea e causar a infecção sistêmica, podendo afetar órgãos como, o fígado, rins e pele (LIN; HEITMAN, 2006; LIU; PERLIN; XUE, 2012), se esse patógeno atingir o sistema nervoso central poderá

causar meningite, encefalite ou meningoencefalite, podendo levar o paciente a morte se não for efetuado o tratamento apropriado (KWON-CHUNG; BENETT, 1992; IDNURM et al., 2005). As manifestações neurológicas estarão presentes de acordo com o grau de acometimento das meninges ou com o aumento da pressão intracraniana (QUEIROZ et al., 2008).

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* são classificadas a partir de sorotipos, sendo que *C. neoformans* possui os sorotipos A (variedade *grubii*), D (variedade *neoformans*) e AD (híbrida entre variedade *neoformans* e *C. gattii*), já *C. gattii* apresenta os sorotipos B e C (RIBAS; BAEZA; RIBEIRO, 2011). Essa classificação distinguiu as espécies e os sorotipos através dos aspectos bioquímicos, biológicos, antigênicos e genéticos (QUEIROZ et al., 2008).

A espécie *C. neoformans* é cosmopolita e afeta principalmente pacientes que possuem algum grau de imunossupressão, sendo o principal microrganismo oportunista que acomete pacientes com SIDA (MURRAY; ROSENTHAL; PFALLER, 2009). Esse patógeno habita o solo, árvores, vegetais, madeira em decomposição e fezes de aves, principalmente de pombos (REIMÃO et al., 2007; BALTAZAR; RIBEIRO, 2008; QUEIROZ et al., 2008).

Já *C. gattii* está relacionado com infecções em indivíduos imunocompetentes que vivem em regiões tropicais e subtropicais, e recentemente foi isolado de países com clima temperado (KIDD et al., 2004; HARRIS et al., 2011; CHEN; MEYER; SORRELL, 2014). Essa espécie geralmente é encontrada em plantas, como *Eucalyptus camaldulensis*, bem como em ocos ou cascas de árvores nativas encontradas nas regiões tropicais e subtropicais (REIMÃO et al., 2007; REFOJO et al., 2008; QUEIROZ et al., 2008; WERTHER, 2011; MAZZA et al., 2013).

As espécies *C. neoformans* e *C. gattii* possuem uma afinidade maior para causar infecções nos pulmões e no sistema nervoso central (MAZIARZ; PERFECT, 2016). Alguns fatores que diferenciam a infecção causada por *C. gattii* de *C. neoformans* é que o primeiro pode acometer com maior incidência o pulmão ou causar infecções neste órgão e no cérebro simultaneamente, como também pode provocar lesões cerebrais mais graves, maior ocorrência de granulomas e necessitar de um tratamento prolongado com antifúngicos (CHEN, et al, 2000; SORREL, 2001; MCMULLAN; SORRELL; CHEN, 2013).

Entre os fatores de virulência dessas espécies podemos citar a formação de melanina, presença da cápsula, secreção de enzimas, como fosfolipase e urease, e

a capacidade de crescimento a 37°C (AMINNEJAD et al., 2016). Esses e outros fatores fornecem proteção contra o sistema imune e facilitam a sobrevivência desses patógenos em diferentes condições (VOELZ; MAY, 2010).

3.4.2 *Trichosporon asahii* e a tricosporonose

O gênero *Trichosporon* apresenta cerca de 40 espécies, as quais podem ocasionar infecções superficiais e profundas em humanos (CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008; VALLADARES et al., 2018). As espécies mais patogênicas são *T. asteroides*, *T. ovoides* e *T. cutaneum* que causam infecções superficiais, como a pedra branca, *T. inkin* que ocasiona infecções superficiais e profundas, e *T. asahii* e *T. mucoides* que estão relacionadas com infecções profundas (CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008).

Esses patógenos habitam o solo, água, vegetais, animais, bem como a microbiota dos humanos, podendo ser encontrado no trato gastrointestinal, mucosas, pele (principalmente na região inguinocrural), unhas e também pode colonizar transitoriamente o trato respiratório (PANAGOPOULOU et al., 2002; DINIZ; FILHO, 2005; SILVESTE JÚNIOR; MIRANDA; CAMARGO, 2010; COLOMBO; PADAVAN; CHAVES, 2011).

A espécie *T. asahii*, antigamente conhecida como *T. beigeli*, é uma levedura oportunista que acomete principalmente pacientes neutropênicos, com doenças hematológicas, transplantados, portadores de SIDA, com queimaduras extensas, que fazem uso de corticosteroides, bem como aqueles que sofreram procedimentos invasivos (possuem cateter, sonda ou válvula cardíaca) (SHANG; YANG; PENG, 2010; COLOMBO; PADAVAN; CHAVES, 2011). *T. asahii* é o agente etiológico da tricosporonose, a qual em pacientes imunocompetentes causa infecções superficiais, como a *Piedra* branca (nódulos moles que podem afetar os pelos das axilas, da barba, da região genital e os cabelos) e em imunocomprometidos causa infecções disseminadas, sendo a principal espécie isolada desse tipo de infecções (AHMAD; AI-MAHMEDD; ZU, 2005; DINIZ; FILHO, 2005; MATSUE et al., 2006; RUAN; CHIEN; HSUEH, 2009; LEMES et al., 2010).

A tricosporonose invasiva é uma manifestação oportunista rara, porém grave, que possui altas taxas de mortalidade, podendo levar a óbito até 80 % dos pacientes (ICHIKAWA et al., 2004; COLOMBO; PADAVAN; CHAVES, 2011; MENEZES et al.,

2012). A forma de contágio pode acontecer através da inoculação de *T. asahii* através de lesões na pele, por dispositivos médicos (cateteres) ou pela via respiratória ou gastrointestinal (KRCMERY et al., 1999; YAMAGATA et al., 2000; PFALLER; DIEKEMA, 2004; CHAGAS-NETO et al., 2009; GUO et al., 2011; MENEZES et al., 2012). Esse tipo de manifestação está comumente relacionado com a presença de biofilme, já que *T. asahii* possui a habilidade de formar biofilme em dispositivos médicos (DI BONAVENTURA et al., 2006; COLOMBO; PADAVAN; CHAVES, 2011; LIAO et al., 2015).

Essa doença geralmente acomete primeiramente o trato gastrointestinal, respiratório e/ou urinário para depois causar disseminação pelo sangue, causando principalmente infecções invasivas profundas (CHOWDHARY et al., 2004; SANCHEZ; LARSEN, 2007; CASTILHO et al., 2009; KURTZMAN; FELL; BOEKHOUT, 2011). Dependendo do grau de imunossupressão do paciente pode ocorrer choque séptico, pneumonia, coriorretinite, síndrome da coagulação intravascular disseminada, quadros de insuficiência respiratória e renal, bem como lesões cutâneas (EBRIGHT; FAIRFAX; VAZQUEZ, 2001; SOOD et al., 2006; VASHISHTHA; MITTAL; GARG, 2012; BASTIDAS et al., 2016; OZKAYA-PARLAKAY et al., 2016; YONG et al., 2017).

Em ágar Sabouraud *T. asahii* forma colônias creme, úmidas ou secas, inicialmente com aspecto liso e ao decorrer do tempo vira rugosa ou cerebriformes, já na análise microscópica podem ser vistos blastoconídios, artroconídios, pseudo-hifas e hifas verdadeiras (CHAGAS-NETO; CHAVES; COLOMBO, 2008; COLOMBO; PADAVAN; CHAVES, 2011). A produção de enzimas, como esterases, fosfolipases, proteases e hemolisinas e a formação de biofilme são alguns fatores de virulência de *T. asahii* que dificultam o tratamento e caracterizam a patogenicidade dessa espécie (DAG; CERIKÇIOGLU, 2006; DI BONAVENTURA et al., 2006; SUN et al., 2012; BENTUBO; GOMPERTZ, 2014).

3.4.3 Gênero *Candida* e a candidíase

Os microrganismos do gênero *Candida* são leveduras que apresentam uma parede celular constituída de quitina, proteínas e polissacarídeos e uma membrana plasmática fosfolipídica formada principalmente por ergosterol (AGUIAR, 2007; WHIBLEY; GAFFEN, 2015).

Existem aproximadamente 200 espécies desse gênero, sendo as mais encontradas na microbiota humana: *Candida albicans*, *C. guilliermondii*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. pseudotropicalis*, *C. lusitaniae* e *C. dubliniensis* (OLIVEIRO, 2011). Essas leveduras vivem como comensais no nosso corpo, podendo ser encontradas na cavidade bucal, trato gastrintestinal, vagina e pele (SENEVIRATNE; SAMARANAYAKE, 2008). Quando ocorre alguma desordem imunológica, as mesmas viram patogênicas e podem causar infecções oportunistas na pele, nas mucosas e até mesmo disseminadas (candidemia) (MONGE, 2006; PEIXOTO et al., 2014).

A candidíase cutânea acomete principalmente regiões úmidas do corpo, como as dobras abdominais, mamárias e da região da virilha, bem como as axilas, espaços interdigitais e unhas (MEZZARI; FUENTEFRIA, 2012; ZAITZ et al., 2017). As lesões são eritematosas, inflamatórias e com pouca presença de descamação, podendo apresentar vesículas ou pústulas esbranquiçadas (MEZZARI; FUENTEFRIA, 2012).

A candidíase mucocutânea é a manifestação clínica mais frequente e atinge a cavidade oral e vaginal. Placas esbranquiçadas estão presentes na mucosa oral e nas bordas laterais da língua, já na região vaginal ocorre corrimento esbranquiçado, com odor desagradável e prurido (MEZZARI; FUENTEFRIA, 2012; ZAITZ et al., 2017).

A candidemia ocupa o quarto lugar das infecções sanguíneas nosocomias do mundo e possui uma taxa de mortalidade de aproximadamente 80 % (PFALLER; DIEKEMA, 2007; WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Geralmente essa forma de infecção atinge pacientes imunocomprometidos, bem como os que fazem uso prolongado de antimicrobianos, possuem cateter venoso central ou recebem nutrição parenteral, podendo acometer diversos órgãos como, rins, fígado, baço, olhos, coração, articulações e cérebro (PEIXOTO et al., 2014; CAGGIANO, 2015). As espécies *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* estão relacionadas com 90% dos casos da candidíase sistêmica, sendo *C. albicans* a principal envolvida, estando presente em cerca de 40 a 50% dos casos, porém as infecções por espécies de *Candida* não *albicans* vem apresentando casos maiores que 50% (PFALLER et al., 2015).

A espécie *C. albicans* é a mais isolada de infecções invasivas e superficiais do mundo, bem como a mais estudada, com diversos fatores de virulência

elucidados (BARBERDO; SGARBI, 2010; BADIEE; ALBORZI, 2011). A cepa *C. tropicalis* está entre a segunda ou terceira espécie causadora de candidemia em pacientes oncológicos, principalmente os neutropênicos que fazem uso de antifúngicos e possuem lesões nas mucosas (PFALLER et.al., 2010; COLOMBO et al., 2013).

A infecção por *C. parapsilosis* acomete principalmente pacientes com presença de cateter ou que se submetem a procedimentos invasivos, podendo causar endocardite, endoftalmite, artrite e peritonite (GIL-ALONSO et al., 2015). A espécie *C. glabrata* é comumente isolada de pacientes idosos e oncológicos, quando comparada com outras de espécies do gênero é menos virulenta, porém apresenta resistência a diversos antifúngicos acarretando taxas de mortalidades altas (ALANGADEN, 2011; SANCHIS et al., 2015).

Frequentemente isolada em hospitais, *C. krusei* acomete pacientes transplantados e com doenças sanguíneas, e é intrinsecamente resistente ao fluconazol (PFALLER et.al., 2010; COLOMBO et al., 2013; SCORZONI et al., 2013). Já *C. dubliniensis* reside como comensal na cavidade oral de poucos indivíduos saudáveis, mas é encontrada comumente em pacientes com AIDS e diabéticos, sendo responsável por apenas 2% das candidemias (BARBERDO; SGARBI, 2010).

As espécies *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis* são polimórficas, ou seja, podem se desenvolver nas formas de leveduras, pseudo-hifas e hifas, contudo outras espécies só possuem a capacidade de formar leveduras e pseudo-hifas, sendo consideradas dimórficas (WHIBLEY; GAFFEN, 2015). Em meio de cultivo ágar Sabouraud dextrose as espécies de *Candida* formam colônias de coloração branca a creme, podendo apresentar textura lisa ou enrugada, brilhante ou seca (LACAZ et., 2002).

Esses microrganismos possuem diversos fatores de virulência, como a dimensão celular, plasticidade fenotípica, tropismo, produção de enzimas extracelulares (fosfolipases e proteinases), capacidade de crescimento a 37 °C, e produção de biofilme, o qual confere mecanismos de resistência aos antifúngicos e capacidade de se adaptar e proteger em diferentes ambientes (MODRZEWSKA; KURNATOWSKI, 2013; SARIGUZEL et al., 2015).

3.5 BIOFILMES

Os biofilmes apresentam-se como um agregado de microrganismos envolvidos por uma matriz extracelular, onde os mesmos podem estar aderidos irreversivelmente em diferentes superfícies (SAUER, 2003; BOGINO et al., 2013; MASÁK, et al., 2014). Todas as espécies de *Candida* possuem a capacidade de formar biofilme, sendo que as cepas *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* tem uma boa capacidade de formação do mesmo (LÓPEZ; VLAMAKIS; KOLTER, 2011; BRITO, 2017). Entre outras leveduras, algumas espécies de *Trichosporon*, como *T. asahii* também são capazes de produzir biofilme (DI BONAVENTURA et al., 2006).

A formação do biofilme fúngico possui três etapas. Na primeira fase as leveduras planctônicas ligam-se ao substrato, gerando interações eletrostáticas e hidrofóbicas que associadas a outros fatores biológicos aderem-se a uma superfície abiótica ou biótica. Após, as células aderidas começam a se proliferar e produzir matriz extracelular, onde se inicia mecanismos de comunicação entre as células que promovem uma expressão diferencial de genes, os quais promovem a migração da forma de leveduras para hifas ou pseudo-hifas, onde as células começam a se entrelaçar e formam uma rede envolvida de matriz extracelular com aspecto tridimensional, caracterizando a maturação do biofilme. A última etapa é marcada pela liberação de leveduras não aderidas ao biofilme para um local onde elas possam colonizar outro ambiente (MUKHERJEE et al, 2005; SUZUKI, 2009; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

A matriz do biofilme tem a capacidade de permitir a circulação de nutrientes no seu interior (DORLAN; COSTERTON, 2002). Relacionado com a comunicação entre as células, o *Quorum sensing* se trata de uma maneira de comunicação entre as espécies presentes no biofilme, atua regulando o crescimento celular desnecessário, bem como controla a competição de nutrientes e possui papel fundamental na disseminação e formação do biofilme (DORLAN, 2002; RAMAGE et al., 2005).

Os biofilmes são responsáveis pela resistência dos microrganismos aos medicamentos antimicrobianos e estão associados às altas taxas de infecções causadas no organismo humano, sendo que cerca de 80% das infecções apresenta o envolvimento de biofilmes, causando maiores taxas de mortalidade e morbidade quando comparado com infecções causadas por microrganismos que não conseguem formar biofilmes (SUN et al., 2013; BRITO, 2017). Podem causar infecções em instrumentos médicos hospitalares, como cateteres, próteses e

implantes, bem como em feridas e gengivas. (HALL-STOODLEY; COSTERTON; STOODLEY, 2004; STEWRAT; FRANKLIN, 2008).

A resistência aos antifúngicos dos microrganismos do gênero *Candida*, bem como de *T. asahii* favorecida pela produção de biofilme se deve, principalmente, pela dificuldade de penetração desses fármacos na estrutura fúngica, a proteção contra o sistema imunológico, bem como o aumento da expressão gênica que facilita mecanismos de resistência, como as bombas de efluxo (SANTANA et al., 2013; YANG et al., 2016). O biofilme também confere a capacidade de adaptação à levedura, onde a mesma consegue alterar o pH do meio, captar melhor aminoácidos, traços de metais e compostos de carbono e nitrogênio (MAYER; HUBE; WILSON, 2013; SILVA et al., 2010).

3.6 FÁRMACOS DISPONÍVEIS PARA O TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR *Candida* spp., *Cryptococcus* spp., E *Trichosporon asahii* E OS PROBLEMAS DESSA TERAPIA

Os fármacos antifúngicos são classificados de acordo com seu mecanismo de ação nas seguintes classes: poliênicos (anfotericina B e nistatina), análogos da pirimidina (flucitosina), azóis (miconazol, cetoconazol, fluconazol, itraconazol, posaconazol, voriconazol e isavuconazol), alilaminas (naftifina e terbinafina) e equinocandinas (caspofungina, micafungina e anidulafungina) (COWEN; STEINBACH, 2008; DENNING; HOPE, 2010; OSTROSKY-ZEICHNER et al., 2010; WILLIAMS; LEWIS, 2011).

A nistatina é utilizada por via tópica devido a sua toxicidade sistêmica, já a anfotericina B por não ser absorvida por via oral somente é administrada por via intravenosa, o que restringe seu uso em hospitais (ELLEPOLA; SAMARANAYAKE, 2000).

Apesar de seus importantes efeitos indesejáveis, como a nefrotoxicidade, a anfotericina B ainda é um dos antifúngicos de escolha para o tratamento de infecções disseminadas causadas por diferentes fungos, incluindo *Candida* spp., *C. gattii* e *C. neoformans* (SUBRAMANIAN; MATHAI, 2005; BENNETT, 2011; RANG et al., 2011; COLOMBO et al., 2013). Entretanto esse medicamento apresenta ação limitada frente *T. asahii*, além disso, já foram relatadas cepas resistentes de diferentes espécies de *Candida*, bem como de *C. neoformans*, *C. gattii* e *T. asahii*

(GIRMENIA et al., 2005; ITURRIETA-GONZÁLEZ et al., 2014; HANSON et al., 2017; KRISHNASAMY et al., 2018).

Os principais antifúngicos utilizados no tratamento da criptococose são anfotericina B isoladamente ou associada com flucitosina e/ou fluconazol (em alguns casos itraconazol), mas muitas vezes esse tratamento pode apresentar falhas terapêuticas (PERFECT et al., 2010).

A flucitosina pode causar distúrbios gastrointestinais, hematológicos e toxicidade hepática (RANG et al., 2011), e a sua utilização em monoterapia deve ser evitada devido ao risco de desenvolvimento de resistência, por isso a flucitosina é utilizada em associação com a anfotericina B pela ação sinérgica, principalmente em infecções sistêmicas causadas por espécies de *Candida* e *Cryptococcus* (RANG et al., 2011; FLEVARI et al., 2013; MORACE; PERDONI; BORGHI, 2014). Contudo, seu uso não é indicado no tratamento da tricosporonose, devido à baixa sensibilidade *in vitro* de *T. asahii* (KONTOYIANNIS et al., 2004; RUAN; CHIEN; HSUEH, 2009).

Os azóis por possuírem uma meia-vida longa permitem a administração de uma ou duas doses por dia (TAVARES, 2001). Em virtude dessa classe inibir a biossíntese das mesmas enzimas do citocromo P450 nas células do fígado dos humanos que produzem colesterol, os mesmos podem causar distúrbios gastrointestinais e toxicidade hepática (CARRILO-MUÑOZ et al., 2006; CATALÁN; MONTEJO, 2006; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2012). Esses fármacos possuem ação frente a diferentes espécies de fungos, sendo utilizados no tratamento de diversas doenças, como na candidíase, criptococose e tricosporonose (LEWIS, 2011; CONG et al., 2017).

No tratamento da tricosporonose causada pelo *T. asahii*, os azóis são os antifúngicos mais recomendados, especialmente os novos triazóis, pois apresentam melhor atividade *in vitro* e *in vivo* quando comparados com outros fármacos (KONTOYIANNIS et al., 2004; RUAN; CHIEN; HSUEH, 2009; HAZIROLAN et al., 2013). Apesar disso, alguns estudos relataram resistência desse microrganismo aos triazóis (PADOVAN et al., 2019), já outras pesquisas demonstraram cepas multirresistentes a anfotericina B, fluconazol, itraconazol, flucitosina e ao voriconazol (WOLF et al., 2001; BASSETTI et al., 2004). O surgimento de *T. asahii* com sensibilidade reduzida aos antifúngicos disponíveis é um motivo de alerta (SILVA, R et al., 2008).

Os poliênicos, azóis e as equinocandinas são os fármacos comumente utilizados no tratamento da candidíase (COSTA et al., 2004; GUALCO et al., 2007; MAUBON et al., 2014; RODRIGUES et al., 2016). Embora a resistência de *Candida* spp. aos azóis não seja muito comum, ela geralmente está associada a tratamentos prolongados devido seu mecanismo micostático, e muitas vezes pode ocorrer resistência cruzada com os antifúngicos dessa classe (PFALLER, 2012). Estudos já relataram resistência de *C. albicans*, bem como de *Candida* não *albicans* aos azólicos (WHALEY et al., 2017).

Entre os derivados das alilaminas, a terbinafina, está disponível nas formas farmacêuticas de uso oral e tópico, sendo utilizada no tratamento de infecções fúngicas tópicas e sistêmicas. A ocorrência de efeitos colaterais é baixa, mas podem ocorrer cefaleia e distúrbios gastrointestinais (KATZUNG; TREVOR, 2017). Já naftifina é comumente utilizada em infecções tópicas (WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016). Essa classe possui uma maior ação frente a espécies de *Candida* resistentes aos azólicos (KABIR; AHMAD, 2013).

A caspofungina, micafungina e anidulafungina fazem parte da classe das equinocandinas e inibem a enzima β -1,3-glucana sintase, responsável pela formação de β -glucano, afetando a síntese da parede da célula fúngica, levando a mesma a morte, sendo utilizadas principalmente em infecções disseminadas (PIGATTO; UCHOA; COSTA, 2009; CORTÉS; RUSSI, 2011). Devido esta enzima não estar presente nas células humanas, as equinocandinas apresentam baixa incidência de efeitos colaterais e o que limita seu uso é o alto custo (WILLIAMS; LEWIS, 2011; TSUI; KONG; JABRA-RIZK, 2016).

Essa classe possui rápida ação fungicida frente espécies de *Candida*, já frente a espécies de *Cryptococcus* e *T. asahii* estudos demonstraram pouca ou nenhuma ação (MARTY et al., 2003; KHAWCHAROENPORN; APISARNTHANARAK; MUNDY, 2007; COLOMBO et al., 2013). A ocorrência de resistência de *Candida* spp. frente as equinocandinas não é muito comum de acontecer, mas já foram relatados alguns casos (GARCIA-EFFRON et al., 2010; BEYDA; LEWIS; GAREY, 2012).

Algumas cepas dos gêneros *Cryptococcus*, *Trichosporon* e *Candida* possuem resistência aos antifúngicos mais utilizados (SILVA et al., 2008; LÓPEZ-MARTÍNEZ, 2010; KHALIL et al., 2015). Neste contexto as pesquisas por novos antifúngicos através de compostos naturais, como os óleos essenciais, surgem como alternativa

terapêutica no combate das infecções causadas por esses microrganismos resistentes.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas da espécie *C. deliciosa* Tenore foram coletadas em maio de 2018, no período da manhã, no 4º distrito do município de São Francisco de Assis – RS (29°28'00.7"S 54°57'48.9"W). O material vegetal foi identificado em junho de 2018 pelo Prof. Dr. Roberto A. Záchia e pela Dr^a. Nelci Rolim Bastos-Záchia e uma excisada foi preparada e armazenada no herbário SMBD (Santa Maria Departamento de Biologia) da UFSM (nº de registro: SMBD 18114). A planta foi cadastrada na gestão de patrimônio genético (nº do processo: ADF8703, SISGEN). Após uma semana da coleta da planta foi realizada a extração do óleo essencial.

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E AVALIAÇÃO DE SEU RENDIMENTO

As folhas de *C. deliciosa* Ten. foram secas, rasuradas e submetidas ao processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, conforme preconizado pela Farmacopéia Brasileira (2010), durante 6 horas para extração do óleo essencial. Após a extração, o óleo essencial foi separado da fase aquosa com auxílio de um funil de separação, utilizando éter etílico P.A como solvente. O óleo extraído foi seco com sulfato de sódio anidro e a fase etérea evaporada para obtenção do óleo essencial. O rendimento foi determinado a partir da relação massa-volume por meio de extrações em triplicata (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). Os resultados do rendimento foram expressos como média \pm desvio padrão. O óleo foi armazenado em frasco âmbar sob refrigeração (\pm 4°C) até a realização dos testes. A caracterização química do óleo essencial foi realizada em agosto de 2018 e os testes antimicrobianos a partir de setembro de 2018.

4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

O óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. foi analisado por cromatógrafo a gás equipado com detector de ionização de chama (GC-FID, Varian Star 3400CX, EUA) segundo metodologia de Teixeira et al (2014) com modificações. Para a análise do óleo, 5 μ L deste foram diluídos em 1 mL de hexano. A amostra foi injetada em injetor

sem divisão (1 μL), operando em modo split na proporção de 20:1 a 250°C. Os compostos foram separados em colunas capilares BPX-5 (25m x 0,22mm x 0,25 μm) (SGE, Austrália). O gás transportador foi hidrogênio a uma pressão constante de 15 psi a uma taxa de fluxo de 1,3 mL min⁻¹. A temperatura inicial da coluna foi de 50°C (mantida por 0,5 min) a 250°C, a uma taxa de 4°C min⁻¹ e mantida por 1 min em isotérmico. O detector foi mantido a 250°C. A quantidade percentual relativa de cada composto foi obtido a partir da área do pico no cromatograma da amostra.

A análise qualitativa dos compostos foi realizada por cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa (GC-MS, Shimadzu QP2010 Plus, Japão). Para estas análises, as condições cromatográficas foram as mesmas descritas acima e o hélio foi utilizado como gás carreador a uma pressão constante de 172,3 kpa. O detector foi operado em modo de ionização por impacto de elétrons com 70eV e faixa de varredura em massa de 35 a 350 m/z. A interface GC-MS e a fonte de íons foram mantidas a 250°C. Uma série de n-alcenos homólogos foi analisada sob as mesmas condições cromatográficas para calcular o índice de retenção linear (IRL). Os compostos foram identificados por comparação com os espectros de massa disponíveis no Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia (NIST) e comparação de IRL experimental com aqueles disponíveis na literatura científica (ADAMS, 2007).

4.4 ENSAIOS DE SUSCETIBILIDADE

4.4.1 Microrganismos

Os microrganismos que foram utilizados nos testes de suscetibilidade pertencem à coleção de fungos do Laboratório de Pesquisas Micológicas (LAPEMI) da Universidade Federal de Santa Maria, RS e estão descritos a seguir: *Candida albicans* ATCC 14053, *C. albicans* Isolado Clínico (IC), *C. glabrata* ATCC 90030, *C. glabrata* IC, *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. parapsilosis* IC, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* IC, *C. dubliniensis* IC, *C. krusei* IC, *Cryptococcus gattii* ATCC 56990, *C. neoformans* IC, *Trichosporon asahii* IC KT438844, *T. asahii* IC KR872656, *T. asahii* IC KR872660, *T. asahii* IC KR872661, *T. asahii* IC KR233247, *T. asahii* IC KR872662, *T. asahii* IC KR872663, *T. asahii* IC KR912064, *T. asahii* IC KR912065 e *T. asahii* IC KT365859.

4.4.2 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A diluição do óleo essencial (OE) de *Citrus deliciosa* foi realizada em um tubo de ensaio estéril em proporção 1:10, onde foram adicionados 10% do OE, 10% de Tween 80 (polissorbato) e 80% de água destilada, esta solução foi agitada em Vortex (Mod. AP56, Phoenix) a fim de se obter uma concentração de 104.800 µg/mL. A partir dessa solução estoque foram realizadas diluições intermediárias (1:100) em caldo RPMI 1640 (Merck, SP, Brazil) tamponado com ácido morfolínico propano sulfônico (MOPS) (Merck, SP, Brazil).

A suscetibilidade dos microrganismos frente ao óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. foi determinada pelo método de microdiluição em caldo RPMI, de acordo com o protocolo M27-A3 aprovado pelo “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2008). Para os ensaios de microdiluição as leveduras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose e incubadas a 35°C em estufa por 48 horas para *Candida spp.*, e *T. asahii* e 72 horas para *C. neoformans* e *C. gattii*. A seguir, as colônias foram suspensas em 2 mL de solução salina 0,9% estéril, para uma turbidez aproximada de 0,5 McFarland. A suspensão do inóculo foi preparada por método espectrofotométrico e a densidade ótica da suspensão de conídios foi ajustada com caldo RPMI 1650 até 1×10^3 UFC/mL. 100 µL dos inóculos foram depositados nos poços de placas de poliestireno com fundo chato já contendo 100 µL do óleo essencial de *C. deliciosa*. As faixas de concentrações finais do óleo nos poços das placas de microdiluição foram de 31,25 – 16.000 µg/mL. Também foi realizado um controle de sensibilidade das cepas frente ao tensoativo utilizado (Tween 80).

Após a distribuição do óleo essencial e inóculos, as placas foram incubadas em estufa, e as Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) determinadas após 48 horas de incubação para *Candida spp.*, e *T. asahii* e 72 horas para *C. neoformans* e *C. gattii*. A leitura das CIMs foi realizada adicionando o revelador cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio considerando-se 100% de inibição quando comparado ao crescimento do controle positivo, para cada microrganismo. Foram considerados resultados promissores valores de CIMs até 500 µg/mL (ALIGIANNIS et al., 2001).

4.4.3 Determinação da concentração fungicida mínima (CFM)

A concentração fungicida mínima foi determinada após a leitura da CIMs, onde alíquotas de 10 µL do sobrenadante dos poços sem crescimento fúngico foram adicionadas em tubos estéreis contendo 500 µL de caldo Sabouraud dextrose. Estes tubos foram incubados em estufa a 35°C, e as CFMs determinadas após 48 horas de incubação para *Candida spp.*, e *T. asahii* e 72 horas para *C. neoformans* e *C. gattii*. A CFM foi considerada como a menor concentração do OE de *C. deliciosa* Ten. capaz de inibir crescimento fúngico quando no meio de cultura (Adaptado de SALIE; EAGLES; LENG, 1996).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBIOFILME DE *C. deliciosa* Ten.

4.5.1 Ensaio de inibição da formação de biofilme

O biofilme das cepas de *C. albicans* ATCC 14053, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. parapsilosis* ATCC 90018 e *T. asahii* (IC) foi formado na superfície de microplacas de poliestireno de 96 poços, de acordo com a metodologia de Souza et al (2017) e Di Bonaventura et al (2006) com algumas modificações. Os microrganismos foram inoculados em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) suplementado com glicose 1% na escala 1 de Mcfarland. Após isso, 100 µL da suspensão fúngica foram adicionados na placa, bem como diferentes concentrações do tratamento do óleo essencial de *C. deliciosa* (CIM obtida frente às espécies citadas, metade da CIM e um quarto da CIM). O caldo BHI sem o microrganismo foi considerado como controle negativo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C.

4.5.2 Ensaio de erradicação de biofilme

O biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. asahii* foi formado de acordo com a metodologia descrita no item anterior (4.5.1). Após a adição de 100 µL do inóculo, as placas de 96 poços foram incubadas a 37°C por 24 horas. Passado esse período as placas foram lavadas com salina para remoção das células não aderidas e então foram adicionados 100 µL de diferentes concentrações do tratamento do óleo essencial de *C. deliciosa* (CIM, metade da CIM, um quarto da CIM e dobro da CIM). O caldo BHI sem o microrganismo foi considerado como

controle negativo. As placas foram novamente incubadas em estufa por 24 horas a 37°C.

4.5.3 Quantificação da biomassa do biofilme

Após o tratamento, as placas foram lavadas com salina para remoção das células não aderidas e secas em estufa a 60°C por 60 minutos para fixar o biofilme no poliestireno. 200 µL de cristal violeta a 1% foram adicionados por 10 minutos e as placas foram lavadas novamente com salina. Por fim, 200 µL de etanol 95% foram adicionados em cada poço por 15 minutos e transferidos para outras placas para leitura em um leitor de placas (Spectramax plus 384, Molecular Devices) em comprimento de onda de 570 nm (O'TOOLE, 2011).

4.6 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE *C. deliciosa* Ten.

4.6.1 Capacidade da captura do radical DPPH (2,2, difenil-2-picrilhidrazil)

A avaliação da atividade antioxidante diante do consumo de DPPH foi realizada de acordo com a metodologia de CHOI e colaboradores (2002) com pequenas modificações. Uma solução etanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 µg/mL. O óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. foi diluído em etanol nas concentrações de 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62 e 7.81 µg/mL (CHOI et al., 2002).

Para a avaliação da atividade antioxidante foi adicionado em um tubo de ensaio 1 mL da solução estoque de DPPH, seguido da adição de 2,5 mL da solução de óleo essencial. Paralelamente, foi preparado o branco, sendo este uma mistura de 1 mL de etanol e 2,5 ml da solução etanólica dos compostos avaliados, já o controle foi preparado com 2,5 mL de etanol e 1 mL da solução de DPPH. Após as amostras serem deixadas por 30 minutos no escuro, a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Spectroquant Pharo 100, Merck) em comprimento de onda de 518nm. A porcentagem da atividade antioxidante foi calculada de acordo com a seguinte equação:

% inibição: $100 - [(Absorbância da amostra - Absorbância do branco) \times 100] / Absorbância do controle.$

Para a obtenção do CI_{50} (concentração de planta capaz de inibir a atividade oxidante de 50 % de DPPH) foram plotados gráficos com os valores de porcentagem da atividade antioxidante do DPPH versus as concentrações analisadas. Para fins de comparação foi testado o padrão de quercetina, por possuir atividade antioxidante reconhecida.

4.6.2 Poder de redução do ferro (FRAP)

A atividade antioxidante pela habilidade de redução do ferro (FRAP) foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996), com pequenas modificações. O reagente FRAP foi preparado a partir da combinação de 25 mL de tampão acetato 300 mM, (pH 3,6), 2,5 mL de uma solução 10 mM de 2,3,5-Trifeniltetrazólio dissolvido em ácido clorídrico 40mM e 2,5 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico hexa-hidratado 20 mM. O reagente de trabalho foi preparado a fresco e aquecido a 37°C por 10 minutos em banho maria antes do uso.

As amostras do óleo essencial de *C. deliciosa* foram diluídas em etanol a fim de se obter uma concentração de 1000 µg/mL. O teste foi realizado em triplicata, a partir da adição de 200 µL da amostra e 1800 µL do reagente FRAP. As amostras foram armazenadas banho maria (37°C) por quatro minutos e a leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro (Spectroquant Pharo 100, Merck) a 593 nm. Para a realização dos cálculos foi utilizada uma curva padrão de sulfato ferroso nas concentrações de 1000 mmol/L até 62,5 mmol/L. Como controle positivo foi utilizado o padrão de quercetina (1000 µg/mL).

4.7 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE DE *C. deliciosa* Ten.

A viabilidade celular foi avaliada através do ensaio de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5-brometo de difeniltetrazólio) descrito por Mosmann (1983) com modificações. As amostras de células mononucleares foram obtidas a partir de sangue periférico, provenientes do descarte do Laboratório de Análises Clínicas da Universidade Franciscana, sob aprovação do Comitê de Ética em Seres Humanos da Instituição (CAAE: 31211214.4.0000.5306 – ANEXO A), com ausência de dados de identificação. As mesmas foram obtidas por punção venosa utilizando tubos com

heparina do tipo Vacutainer® (BD Diagnostics, Plymouth, Reino Unido), que foram utilizados para separar as células mononucleares.

Para isso, 100 µL das células mononucleares de sangue periférico (CMSP) (2×10^5 células/mL) suspensas em meio de cultura apropriado, contendo caldo RPMI 1640, com adição de 10% de soro bovino fetal e 1% de penicilina/estreptomicina foram semeadas nas placas de 96 poços e expostas a concentrações crescentes (500 µg/mL – 16000 µg/mL) do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. diretamente diluídos em meio e incubadas por 24 horas a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. Depois do tratamento e da incubação, 20 µL do MTT (500 µg/mL) em PBS foram adicionados a cada poço e a placa novamente incubada a 37°C por 4 horas. O controle negativo foi considerado como o meio contendo somente as células, sem nenhum tratamento. Além disso, como o óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. foi solubilizado em 10 % de Tween 80, um controle contendo 10 % deste composto também foi exposto às células para avaliar uma possível interferência. Todos os testes foram realizados em triplicata.

Por fim, o meio foi removido e 100 µL de DMSO (dimetilsulfóxido) foram adicionados em cada poço. Após 10 minutos de incubação a 37°C, a absorbância da placa foi lida a 570 nm usando um leitor de TP-Reader (Thermoplate, China). A porcentagem da viabilidade celular foi calculada como: (Absorbância das células Tratadas/Absorbância das células controle) x 100.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística da atividade antibiofilme do óleo essencial de *C. deliciosa* foi realizada através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Tukey* quando apropriado. A atividade antioxidante foi analisada pelo teste T de *Student*. A citotoxicidade foi avaliada através de ANOVA de uma via, seguida pelo teste de *Dunnett*. Os ensaios estatísticos foram realizados no programa *Graphpad prism* 6.0 (Graphpad Software, INC). Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

A média geométrica da CIM e CFM foi calculada no Microsoft Office Excel 2016 (Microsoft Informatica Ltda., São Paulo, Brasil).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. deliciosa*

As partes aéreas de *C. deliciosa* Ten. (120 g) foram submetidas ao processo de hidrodestilação originando $0,97\% \pm 0,04$ de óleo essencial. Em geral, os rendimentos de óleos essenciais são baixos, normalmente inferiores a 1%, sendo que as variações de rendimento podem estar relacionadas com pequenas alterações causadas por fatores genéticos e ambientais, bem como o método e tempo de extração utilizado (BRUNETON, 1991; DE OLIVEIRA et al., 2012). Almeida (2013) ao extrair o óleo essencial das folhas da espécie citada obteve rendimento de 0,94%, valor bem próximo do obtido em nosso estudo.

A análise cromatográfica do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. identificou 12 compostos (Tabela 1 e Figura 2), sendo *N*-metil-antranilato de metila (75,1%), γ -terpineno (13,8%) e Limoneno (7%) os majoritários.

Tabela 1- Constituição química do óleo essencial das folhas de *C. deliciosa* Ten.

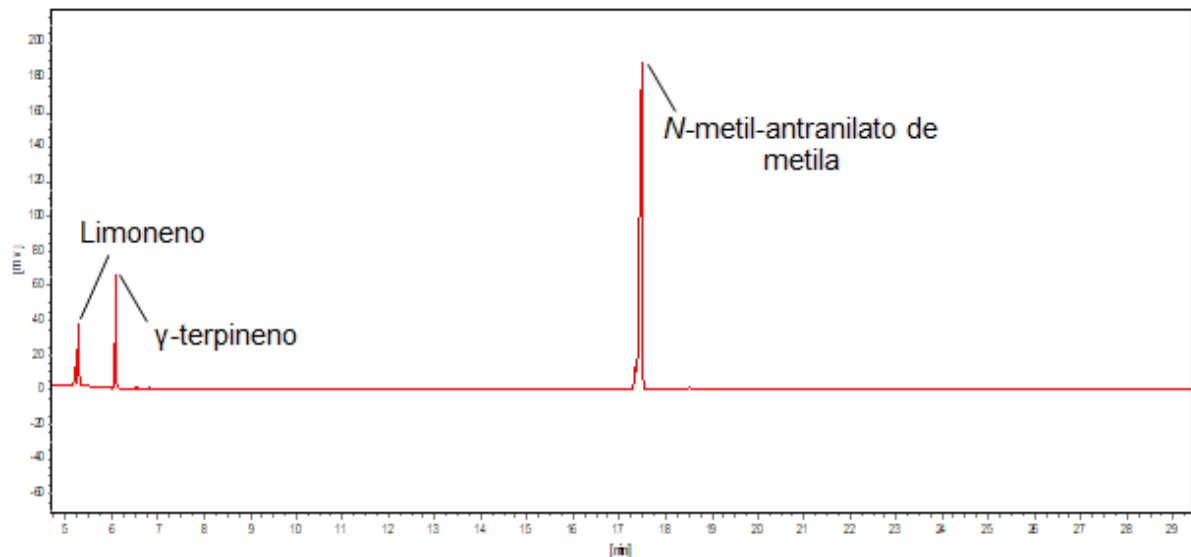
TR	Compostos	IRL CAL	IRL LIT	%
5,22	o-cimeno	1014	1019	1,9
5,29	Limoneno	1017	1020	7,0
5,50	Trans- β -Ocimeno	1026	1046	0,1
6,09	γ -terpineno	1051	1062	13,8
6,83	Terpinoleno	1083	1087	0,4
14,07	<i>N</i> -metil-antranilato	1312	1331	0,1
17,37	β -cariofileno	1414	1419	0,8
17,51	<i>N</i> -metil-antranilato de metila	1419	1402	75,1
18,53	α -Humuleno	1452	1456	0,3
19,80	β -chamigreno	1492	1489	0,3
20,17	BHT	1504	1508	0,1
22,46	Óxido de Cariofileno	1582	1581	0,1

TR: Tempo de retenção expresso em minutos. IRL LIT: Índice de retenção linear da literatura.
IRL CAL: Índice de retenção linear calculado (com base na série homóloga de n-alcanos C7-C30).

O presente trabalho é um dos pioneiros a estudar a constituição química do óleo essencial das folhas de *C. deliciosa*, as quais foram coletadas no outono da região sul. Outro estudo, que também avaliou a composição química das folhas de *C. deliciosa* coletadas no verão da região Nordeste do Brasil, elucidou como compostos majoritários: *N*-metil-antranilato de metila (71,5%), γ -terpineno (13,5%) e limoneno (4,7%) (ALMEIDA, 2013), apesar de o OE ser obtido em outra região e

estação, os resultados foram semelhantes com o do nosso trabalho (Tabela 1). Já o óleo essencial obtido das cascas da mesma espécie apresentou como compostos majoritários: limoneno (77%) e γ -terpineno (13,%) (SIMAS et al., 2017).

Figura 2 - Perfil cromatográfico do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten.



Fonte: (O Autor, 2020).

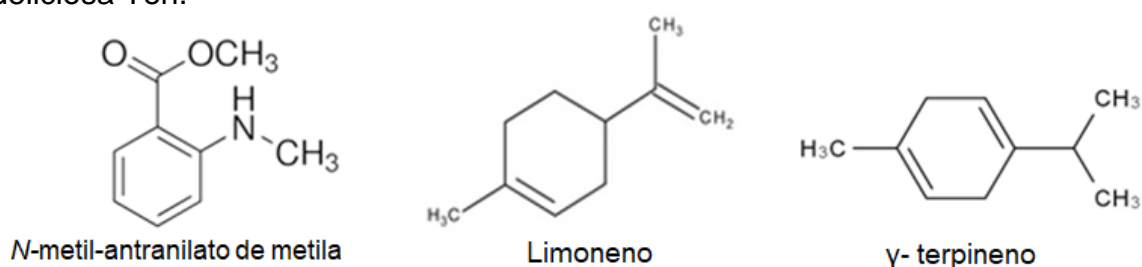
O composto *N*-metil-antranilato de metila (Figura 3), também conhecido como dimetil antranilato, é classificado como um protoalcaloide, compostos que possuem o átomo de nitrogênio fora do heterociclo (SIMÕES et al., 2010; SILVA, C et al., 2008). Os alcaloides estão presentes em diferentes famílias de plantas, sendo encontrados também na família Rutaceae, da qual *C. deliciosa* faz parte (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; MORAIS; BARCELLOS; REDAELLI, 2006). Este constituinte é um dos principais compostos voláteis, bem como o responsável pelo odor adocicado e sabor amargo das espécies de *Citrus*, especialmente de *C. deliciosa* (LOTA et al., 2000; DUGO et al., 2011). Entre as propriedades biológicas deste composto, estudos elucidaram ação repelente de aves quando adicionado na ração animal (MASON et al., 1985; GLAHN; MASON; WOODS, 1989).

O γ -terpineno (Figura 3) faz parte da classe dos monoterpenos (HASSANPOURAGHDAM et al., 2009). Estudos sobre este composto isolado relataram atividade antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e citotoxicidade frente linhagens tumorais de melanoma (FOT; INGOLD, 2003; JAAFARI et al., 2007;

SATO; KRIST; BUCHBAUER, 2007; LI; LIU, 2009; GIWELI et al., 2012; FERRAZ et al., 2013; RAMALHO et al., 2016).

Também classificado como monoterpeno, o Limoneno (Figura 3) é um dos principais compostos encontrado nos óleos essenciais das frutas cítricas (SINGH et al., 2010; NASCIMENTO et al., 2019). Algumas de suas atividades farmacológicas já elucidadas são ações antifúngicas e antioxidantes (ÜNAL et al., 2012; LOIZZO et al., 2016). Os monoterpenos são os principais compostos encontrados nos óleos essenciais e caracterizam-se por apresentar hidrocarbonetos com dez carbonos em sua estrutura. Diversas famílias de plantas possuem estes compostos, bem como a família Rutaceae, da qual pertence *C. deliciosa* (SIMÕES et al., 2010).

Figura 3 - Estrutura química dos compostos majoritários do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten.



Fonte: (GCMSsolution Workstation software, Japão, 2020).

6.2 ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM) de *C. deliciosa* frente às leveduras estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2- Atividade antimicrobiana do óleo essencial de bergamota.

Microrganismos	CIM ^a	CFM ^b
<i>C. albicans</i> ATCC 14053	2000	> 16000
<i>C. albicans</i> IC	8000	> 16000
<i>C. albicans</i> IC	8000	> 16000
Média geométrica	5040	> 16000
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	4000	> 16000
<i>C. tropicalis</i> IC	4000	> 16000
Média geométrica	4000	> 16000
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	8000	> 16000
<i>C. glabrata</i> IC 01	4000	> 16000

<i>C. glabrata</i> IC 02	4000	> 16000
Média geométrica	5040	> 16000
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	8000	> 16000
<i>C. parapsilosis</i> IC 01	2000	> 16000
Média geométrica	4000	> 16000
<i>C. dubliniensis</i> IC 01	1000	> 16000
<i>C. dubliniensis</i> IC 02	1000	> 16000
<i>C. dubliniensis</i> IC 03	2000	> 16000
Média geométrica	1260	> 16000
<i>C. krusei</i> IC 01	4000	> 16000
Média geométrica	4000	> 16000
<i>C. gattii</i> ATCC 56990	500	2000
Média geométrica	500	2000
<i>C. neoformans</i> IC 01	500	2000
<i>C. neoformans</i> IC 02	500	2000
<i>C. neoformans</i> IC 03	500	4000
<i>C. neoformans</i> IC 04	250	2000
<i>C. neoformans</i> IC 05	250	2000
Média geométrica	379	2298
<i>T. asahii</i> IC KR872660	250	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KR872661	250	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KT365859	500	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KT438844	500	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KR912065	500	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KR912064	500	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KR233247	500	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KR872662	1000	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KR872663	500	> 16000
<i>T. asahii</i> IC KR872656	500	> 16000
Média geométrica	467	> 16000

^a CIM: concentração inibitória mínima expressa em µg/mL.

^b CFM: concentração fungicida mínima expressa em µg/mL.

O óleo essencial de *C. deliciosa* apresentou ação inibitória frente a todas as cepas testadas. Os maiores valores de CIM foram obtidos contra as espécies de *Candida*, os quais variaram de 1000 µg/mL a 8000 µg/mL. Os melhores resultados foram encontrados frente às cepas de *C. neoformans* (CIMs variaram de 250 µg/mL a 500 µg/mL), *C. gattii* (CIM = 500 µg/mL) e *T. asahii*, onde os CIMs foram de 250 µg/mL a 1000 µg/mL.

Nas concentrações testadas o óleo essencial não apresentou ação fungicida contra *Candida* spp. e *T. asahii*. O mesmo só exibiu atividade fungicida frente *C.*

gattii (CFM = 2000 µg/mL) e *C. neoformans* (CFMs variaram de 2000 a 4000 µg/mL). Estudos avaliaram a ação antimicrobiana de diferentes óleos essenciais, onde as plantas *Piper guineense*, *Cyperus articulatus*, *Xylopiya aethiopica* e *Liquidambar styraciflua* apresentaram somente ação fungistática frente a diferentes espécies de *Candida* e *T. asahii* (MANCARZ et al., 2016; HÉRITIER et al., 2017). Já *Laurus nobilis* e *Schinus molle* exibiram atividade fungicida contra *C. neoformans* (PINHEIRO et al., 2017; DO PRADO et al., 2019).

Também foi realizada a ação antifúngica do Tween 80 a 10%, mesma concentração utilizada para realizar a diluição do óleo essencial. Essa substância não apresentou atividade antimicrobiana contra as leveduras testadas (resultados não mostrados). Alguns estudos também avaliaram a ação antifúngica do Tween 80 a 10% e revelaram que nesta concentração, o mesmo não possuiu ação (DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011).

Certos autores classificam os produtos naturais como inibidores fortes, moderados e fracos do crescimento dos microrganismos. Neste caso, Aligiannis e colaboradores (2001) relacionaram os óleos essenciais como inibidores fortes do crescimento fúngico com CIM de até 500 µg/mL, inibidores moderados com CIM entre 600 e 1500 µg/mL e fracos inibidores com CIM acima de 1600 µg/mL. Dessa forma, considerando as médias geométricas obtidas para cada espécie testada (Tabela 2) e os conceitos de Aligiannis et al (2001), pode-se inferir que o óleo essencial de *C. deliciosa* demonstrou forte ação frente *C. gattii*, *C. neoformans* e *T. asahii*. Moderada ação foi visualizada contra *C. dubliniensis*, já fraca inibição foi apresentada sobre as demais espécies de *Candida*.

Estudos sobre as propriedades antimicrobianas do óleo essencial de *C. deliciosa* são escassos. Entretanto, Caccioni e colaboradores (1998) avaliaram a ação do óleo essencial obtido da casca dos frutos de *C. deliciosa* e obtiveram bons resultados contra *Penicillium digitatum* e *Penicillium italicum*. Um estudo recente da atividade antifúngica do óleo essencial das cascas da mesma espécie, relatou inibição do crescimento micelial de *Sclerotinia sclerotiorum*, a qual pode estar relacionada à alta concentração de limoneno presente (DIAS et al., 2019).

Através da técnica de disco-difusão, uma pesquisa avaliou a atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *C. deliciosa* frente *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Enteritidis*, *Salmonella Typhimurium* e *Staphylococcus aureus*, e conclui que o mesmo apresentou ação contra todas as

espécies citadas (TONELLI; GEROMEL; FAZIO, 2018). Cabe ressaltar, que embora não sejam as mesmas espécies de microrganismos testadas ou nem a mesma parte da planta utilizada, os estudos citados acima reafirmam a presença da atividade antimicrobiana de *C. deliciosa*.

A atividade antifúngica de plantas e de seus produtos secundários é extensivamente pesquisada e alguns trabalhos comprovam a ação destes compostos frente a diferentes espécies de leveduras oportunistas. Waikedre et al (2010) avaliaram a ação antifúngica do óleo essencial de *Citrus hystrix* e obtiveram CIM de 75 µg/mL e 50 µg/mL contra *C. albicans* e *C. neoformans*, respectivamente.

Outro estudo avaliou a ação do óleo essencial de *Callitris neocaledonica* frente *C. neoformans*, *C. gattii* e *Candida* spp., este composto apresentou CIM de 1000 µg/mL frente as espécies *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata* e de 250 µg/mL frente *C. neoformans* e *C. gattii* (WAIKEDRE et al., 2012).

Castro e colaboradores (2015) verificaram a ação antifúngica do óleo essencial de *Psidium cattleianum*, onde o mesmo apresentou CIM de 125 µg/mL contra *C. lipolytica* e *C. guilliermondii*, e de 104,2 µg/mL, 166,7 µg/mL e 41,77 µg/mL frente *C. parapsilosis*, *C. albicans* e *T. asahii*, respectivamente. Estudo recente com o OE de *Tagetes minuta* obteve CIM de 54,63 µg/mL para *C. parapsilosis* e 28,33 µg/mL contra *T. asahii* (DE OLIVEIRA et al., 2019). Os estudos citados corroboram que as plantas medicinais, especialmente os óleos essenciais, possuem ação antifúngica, particularmente contra *Candida* spp., *C. neoformans*, *C. gattii* e *T. asahii*.

A atividade antifúngica apresentada pelo óleo essencial de *C. deliciosa* pode estar relacionada com a presença de seus compostos majoritários, como o *N*-metil-antranilato de metila, o qual é um alcaloide, compostos que possuem atividade antimicrobiana comprovada, bem como com a presença do γ -terpineno e dl-limoneno, que pertencem à classe dos terpenos que também possuem atividade antifúngica descrita na literatura (SIMÕES et al., 2010; GIWELI et al., 2012; ÜNAL et al., 2012). Entretanto, não podemos associar a ação antimicrobiana somente aos seus compostos majoritários, mas também ao efeito sinérgico ou aditivo dos mesmos com os compostos minoritários (VIUDA-MARTOS et al., 2008; CAROVIĆ-STANKO et al., 2010).

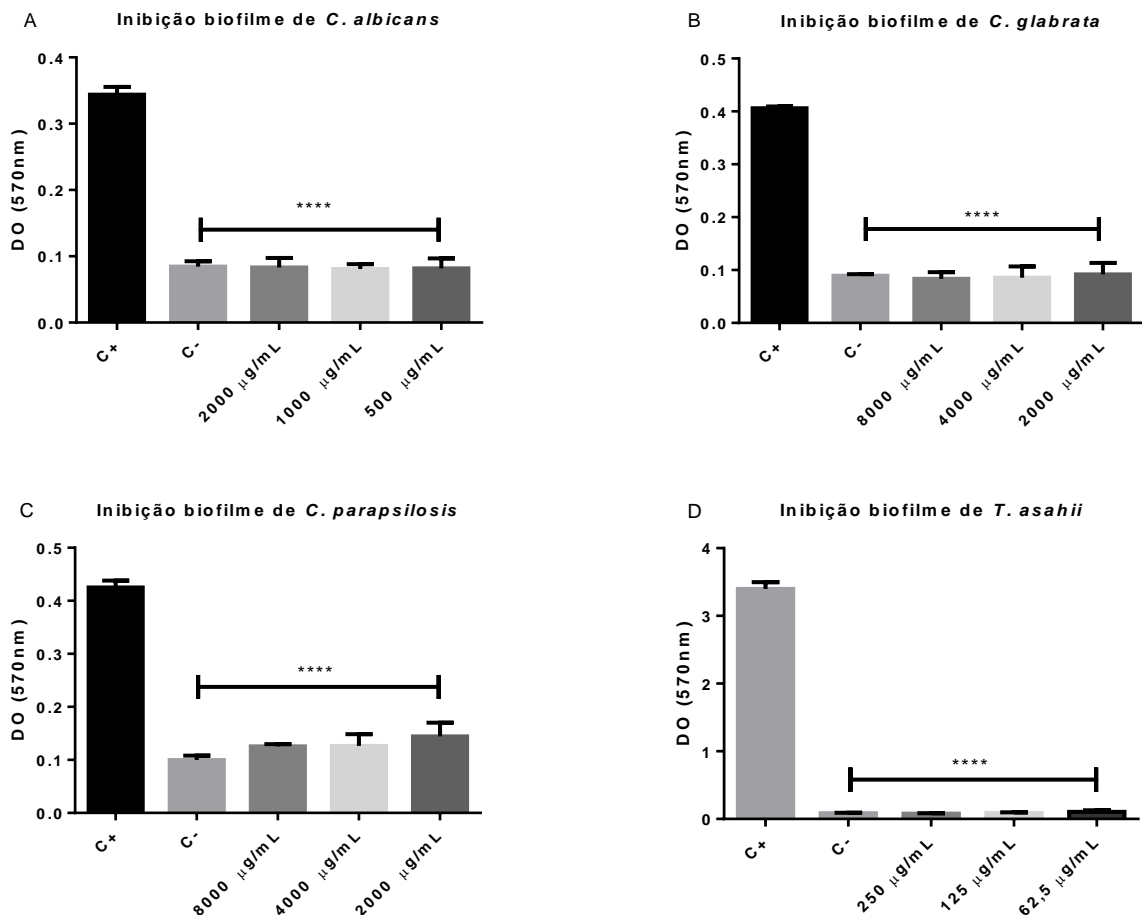
Os óleos essenciais possuem diferentes mecanismos de ação antifúngica, estes constituintes são capazes de inibir enzimas, degradar o material genético ou impedir a sua formação, bem como, devido a sua característica lipofílica, conseguem

penetrar na camada fosfolipídica da membrana celular, degradá-la e levar ao extravasamento de seus constituintes (VIUDA-MARTOS et al., 2008; TYAGI; MALIK, 2011; XING et al., 2012).

6.3 ATIVIDADE ANTIBIOFILME

A ação do óleo essencial de *C. deliciosa* na formação do biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. asahii* está apresentada na Figura 4.

Figura 4 - Atividade inibitória do OE de *C. deliciosa* Ten. frente biofilmes de *Candida* spp. e *T. asahii*



Efeito do óleo essencial de *C. deliciosa* frente à formação do biofilme de *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B), *C. parapsilosis* (C) e *T. asahii* (D). Os resultados são expressos como percentagem de inibição do biofilme em relação ao controle não tratado. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. D.O: Densidade ótica. C+: Controle Positivo. C-: Controle Negativo.

Fonte: (O autor, 2020).

Pode-se perceber que tanto as CIMs, como as concentrações sub-inibitórias utilizadas do óleo essencial de *C. deliciosa* foram capazes de interferir na formação dos biofilmes de *Candida* spp. e de *T. asahii* (Figura 4), diminuindo-os significativamente. Devido às concentrações menores também apresentarem efeitos inibitórios, as mesmas poderiam ser utilizadas no controle de biofilmes produzidos pelos microrganismos citados. Até o momento, pesquisas sobre a ação de óleos essenciais de espécies de *Citrus* e *C. deliciosa* contra biofilmes são escassas, sendo o presente estudo um dos pioneiros a testar a atividade antibiofilme do óleo essencial de *C. deliciosa*.

Alguns estudos relataram que os óleos essenciais atuam em biofilmes de *Candida* spp. impedindo a produção de formas filamentosas e de matriz extracelular, danificando a membrana celular, bem como modificando a hidrofobicidade da superfície celular fúngica bloqueando sua adesão e interação com as superfícies bióticas ou abióticas (SOOKTO et al., 2013; KHAN et al., 2014; RAUT; KARUPPAYIL, 2016; TOBOUTI et al., 2016; RAJKOWSKA; NOWICKA-KRAWCZYK; KUNICKA-STYCZYŃSKA, 2019). Embora até o presente momento não sejam encontrados relatos na literatura da atividade de óleos essenciais em biofilmes de *T. asahii*, acredita-se que o mecanismo de ação dos mesmos seja parecido com os citados anteriormente, pois *T. asahii* é uma levedura e compartilha de características semelhantes com as espécies de *Candida*.

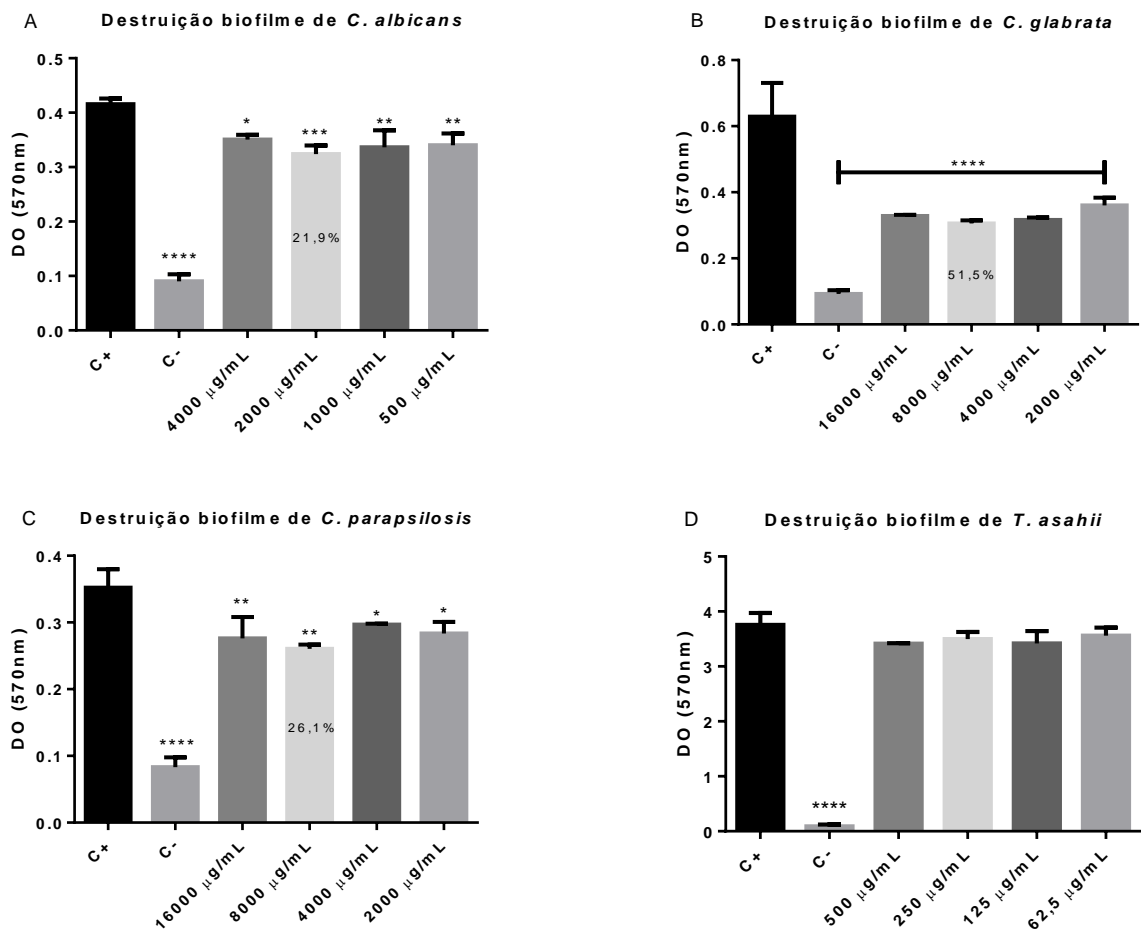
Supõe-se que devido às características lipofílicas e voláteis dos óleos essenciais, os mesmos possuem uma melhor ação em biofilmes do que os antifúngicos, pois conseguem atingir melhor a matriz extracelular polimérica, ocasionando um maior contato e penetração nas células ali presentes, resultando na desorganização e no menor desenvolvimento dos biofilmes (KHAN; AHMAD, 2012; KHAN et al., 2014).

Pires e colaboradores (2011) avaliaram a ação antibiofilme dos óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Juniperus virginiana*, onde *C. zeylanicum* inibiu a formação do biofilme de *C. albicans* e *C. parapsilosis* nas concentrações de 250 µg/mL e 125 µg/mL, respectivamente, já *J. virginiana* impediu a formação do biofilme de ambas espécies em 4000 µg/mL. Outro estudo com os óleos essenciais de *Carum copticum* e *Thymus vulgaris* obteve inibição da formação do biofilme de *C. albicans* com concentrações subinibitórias (KHAN et al., 2014).

A atividade do farnesol (sesquiterpeno) em biofilme de *T. asahii* foi avaliada recentemente, este composto na concentração de 300 μM foi capaz de inibir a formação do biofilme de *T. asahii* em 80 % (CORDEIRO et al., 2019). As pesquisas citadas confirmam que os produtos naturais podem apresentar ação antibiofilme em diferentes concentrações, bem como em concentrações subinibitórias, como as que foram obtidas em nosso estudo.

A ação do óleo essencial de *C. deliciosa* na redução da biomassa dos biofilmes está expressa na figura a seguir (Figura 5).

Figura 5 - Atividade do OE de *C. deliciosa* Ten. frente biofilmes de *Candida* spp. e *T. asahii*.



Efeito do óleo essencial de *C. deliciosa* sobre o biofilme de *C. albicans* (A), *C. glabrata* (B), *C. parapsilosis* (C) e *T. asahii* (D). Os resultados são expressos como percentagem de destruição do biofilme em relação ao controle não tratado. Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. D.O: Densidade ótica. C+: Controle Positivo. C-: Controle Negativo.

Fonte: (O autor, 2020).

Todas as concentrações utilizadas do óleo essencial conseguiram reduzir significativamente a biomassa do biofilme das espécies de *Candida*. Os melhores resultados obtidos foram com a CIM, onde a mesma reduziu em 51,5%, 26,1% e 21,9%, os biofilmes de *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*, respectivamente. Já frente *T. asahii* nenhuma concentração utilizada do óleo essencial de *C. deliciosa* foi capaz de reduzir significativamente a biomassa do biofilme.

Estudos revelaram que os óleos essenciais são capazes de interferir no metabolismo e reduzir a biomassa de biofilmes formados. Palmeira-de-Oliveira et al (2012) avaliaram a ação do óleo essencial de *Thymra capitata* frente biofilmes de *Candida* spp., a CIM deste composto foi capaz de reduzir em 28,38%, 17,76% e 45,11% a biomassa do biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, respectivamente. Já o dobro da CIM nesse estudo diminuiu o biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* em 71,96%, 39,43% e 64,50%, respectivamente (PALMEIRA-DE-OLIVEIRA et al., 2012). O estudo citado corrobora com nossos resultados (Figura 5), apesar do dobro da CIM em comparação com a CIM não ter diminuído em grandes proporções os biofilmes das espécies de *Candida*, a mesma foi capaz de reduzir significativamente a biomassa.

A ação da berberina (alcaloide isoquinolínico isolado de algumas espécies de plantas) frente biofilmes maduros de *T. asahii* foi avaliada e constatou-se que as células sesses desse microrganismo apresentaram-se resistentes a esse composto (CONG et al., 2017). Em nosso estudo o óleo essencial de *C. deliciosa* também não foi capaz de reduzir a biomassa do biofilme de *T. asahii* (Figura 5).

Os biofilmes conferem proteção aos microrganismos, pois impedem a entrada dos antifúngicos na matriz extracelular, estando relacionados com a resistência de *T. asahii* e *Candida* spp. aos medicamentos disponíveis para o tratamento das doenças que os mesmos causam (DI BONAVENTURA et al., 2006; COLOMBO; PADAVAN; CHAVES, 2011; TAFF et al., 2013).

Um estudo realizado demonstrou que apesar das células planctônicas de *T. asahii* apresentarem-se sensíveis aos antifúngicos triazólicos, estes medicamentos não foram ativos frente biofilmes dessa espécie (SUN et al., 2012). Os biofilmes de *Candida* spp. também demonstram-se mais resistentes aos antifúngicos do que suas células livres, necessitando de concentrações maiores para obter-se um tratamento efetivo (KUHN; GHANNOUM, 2004; RAJENDRAN et al., 2010).

6.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante do óleo essencial de *C. deliciosa* Ten. está expressa na tabela a seguir (Tabela 3).

Tabela 3 - Atividade antioxidante do óleo essencial de *C. deliciosa*.

	DPPH (Cl ₅₀ µg/mL) ^a	FRAP (µM Fe(II)/g)
<i>C. deliciosa</i> Ten.	1600,3±57,1****	0,513±0,009****
Quercetina	5,3±0,27	21,7±0,244

Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP). O ensaio de DPPH e poder antioxidante (FRAP) foram analisados através de Teste t de *Student*. Valores com p <0,05 foram considerados estatisticamente significativos. Sendo **** p <0,0001.

^a Cl₅₀: concentração capaz de inibir 50% do radical livre.

Conforme observado na tabela 3, no ensaio de captura de DPPH, o óleo essencial de *C. deliciosa* apresentou fraca ação antioxidante quando comparado com o padrão quercetina. O mesmo foi notado no ensaio de poder de redução do íon ferro (FRAP), já que o óleo essencial demonstrou baixa capacidade de doação de elétrons quando comparado com o padrão quercetina.

O radical DPPH apresenta coloração púrpura, porém quando reage com substâncias doadoras de elétrons ou de hidrogênio, o mesmo sofre redução e adquire coloração amarela, quanto maior o grau de descoloração, maior o potencial de atividade antioxidante do composto testado (OLIVEIRA et al., 2009; RASHID et al., 2013). O ensaio de DPPH é um método simples, reprodutível e muito utilizado na indústria alimentícia (CHOI et al., 2000).

Outros óleos essenciais da família *Citrus* também foram avaliados quanto a sua ação antioxidante pelo método de DPPH. Os óleos essenciais de *C. reticulata*, *C. aurantium* e *C. limon* apresentaram Cl₅₀ de 475,2 µg/mL, 4786 µg/mL e 16145 µg/mL, respectivamente (AAZZA; LYOUSSI; MIGUEL, 2011; BONESI et al., 2018), os quais são considerados valores de Cl₅₀ altos, indicando baixo poder antioxidante contra o radical DPPH. Esses resultados são semelhantes com o obtido em nosso estudo e corroboram que alguns óleos essenciais da família *Citrus* apresentam baixa ação antioxidante.

No ensaio do poder de redução do íon ferro (FRAP) verifica-se a capacidade dos compostos em reduzir o complexo férrico-tripiridiltriazina (Fe³⁺-TPZ) em

complexo ferroso (Fe^{2+} -TPZ), o qual apresenta coloração azul ou violeta, sendo essa mudança de coloração avaliada em espectrofotômetro (BENZIE; STRAIN, 1996; TUNDIS et al., 2016).

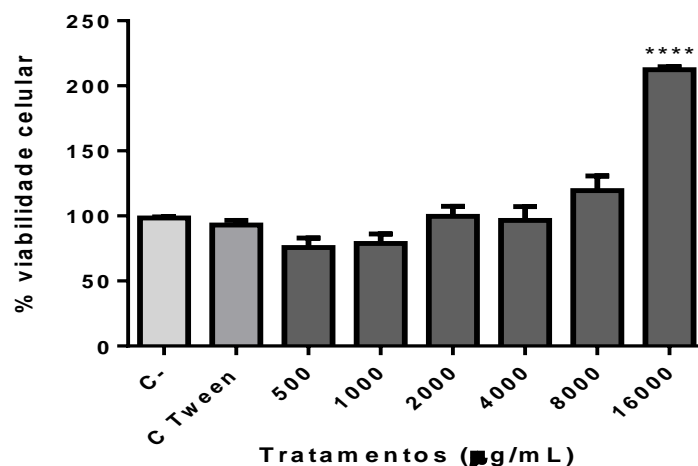
Através da técnica de FRAP alguns óleos essenciais também foram avaliados quando ao seu poder de doação de elétrons. O óleo essencial de *Citrus bergamia* não expressou atividade na redução do íon ferro, já os óleos essenciais de *C. sinensis* e de *C. reticulata* exibiram um baixo poder de doação de elétrons apresentando $1 \mu\text{M Fe(II)/g}$ e $3,4 \mu\text{M Fe(II)/g}$, respectivamente (BONESI et al., 2018).

A atividade de produtos naturais para combater compostos oxidantes está relacionada com seus constituintes bioativos, seja através da ação dos compostos majoritários ou do sinergismo destes com os que estão presentes em menor concentração (ABDALLA; ROOZEN, 1999). Porém, apesar do óleo essencial de *C. deliciosa* apresentar terpenos em sua composição, como o γ -terpineno e dl-Limoneno (Tabela 1), compostos que possuem ação antioxidante descrita na literatura (WEY; SHIBAMOTO, 2007; GIWELI et al., 2012), nas concentrações testadas o mesmo não apresentou atividade antioxidante satisfatória.

6.5 CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *C. deliciosa*

Os resultados da citotoxicidade do óleo essencial de *C. deliciosa* estão demonstrados na figura a seguir (Figura 6).

Figura 6 - Avaliação da viabilidade celular por MTT do óleo essencial de *C. deliciosa*



Ensaio de MTT com 24 horas de incubação. Resultados expressos como porcentagem do controle negativo (100%). Os dados são apresentados como % do grupo controle não tratado (C-). Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão (DP). As análises foram realizadas por ANOVA de uma via seguida pelo teste post hoc de Dunnett. Valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ **** $p < 0,0001$. C-: controle negativo. C Tween: controle tween.

Fonte: (O autor, 2020).

As concentrações testadas do óleo essencial de *C. deliciosa* não foram capazes de reduzir a viabilidade celular. Somente a concentração mais alta mostrou diferença significativa com o controle negativo, apresentando um aumento na taxa de proliferação celular. Os resultados obtidos demonstram que o óleo essencial não possui citotoxicidade. O Tween 80 (polissorbato) utilizado para realizar as diluições do óleo essencial também não demonstrou toxicidade.

Esses resultados apontam que o óleo essencial de *C. deliciosa* poderia ser base para uma promissora formulação, que poderia em um futuro ser utilizado com segurança para o tratamento de infecções e biofilmes fúngicos, como os causados por *Candida* spp., *C. gattii*, *C. neoformans* e *T. asahii*, já que os resultados antifúngicos e antibiofilmes obtidos em nosso estudo com esse óleo essencial (Tabela 2 e Figura 4 e 5) estão dentro das concentrações que não apresentaram citotoxicidade.

Na técnica de MTT, o reagente brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio incorpora-se nas células viáveis e é convertido em cristais de formazan, o qual possui coloração roxa, que é quantificada em espectrofotômetro, sendo o valor da absorbância proporcional ao número de células viáveis (VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011). Essa metodologia é amplamente utilizada para estimar a citotoxicidade de produtos naturais, sendo considerada confiável, simples e sensível (DUTRA et al., 2012).

Alguns estudos demonstram que os óleos essenciais do gênero *Citrus* não apresentam citotoxicidade. O óleo essencial das cascas dos frutos de *C. deliciosa* não demonstrou citotoxicidade em linhagens de fibroblastos renais de hamsters (EL-HAWARY et al., 2013). Em macrófagos de camundongos, o óleo essencial de *C. medica* também não apresentou nenhuma toxicidade (MENICHINI et al., 2011). Os óleos essenciais das espécies *C. grandis*, *C. erythrosa*, *C. tangerina* Hort. ex Tanaka e *C. aurantium* não reduziram significativamente a viabilidade de fibroblastos

dérmicos humanos (BAIK et al., 2008). A espécie *C. sinensis* também não apresentou citotoxicidade frente células epiteliais humanas (RUIZ-PÉREZ et al., 2016).

As células mononucleares sanguíneas periféricas estão presentes em grande quantidade no sistema circulatório e são capazes de refletir danos citotóxicos recentes quando expostas a algum composto tóxico. Por isso, elas são consideradas um modelo *in vitro* promissor para diversos estudos, já que são utilizadas há anos como biomarcadores de citotoxicidade (MALUF; RIEGEL, 2011).

A toxicidade em células mononucleares humanas de óleos essenciais também é amplamente estudada. Os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon citratus* e *Minthostachys verticillata* não demonstraram efeitos citotóxicos frente a esse tipo de linhagem celular (ESCOBAR et al., 2012; JAMUNA et al., 2017; RANGEL et al., 2018). Estes resultados coincidem com o do presente estudo, demonstrando que em determinadas concentrações os óleos essenciais são seguros para o uso humano.

A proliferação celular na concentração de 16000 µg/mL pode ser justificada pela presença de uma maior concentração de limoneno, composto que está presente no óleo essencial de *C. deliciosa* (Tabela 1). Estudos demonstraram que esse composto é capaz de estimular a proliferação de linfócitos (MANUELE; FERRARO; ANESINI, 2008; ROBERTO et al., 2010). Além disso, outro fator que poderia justificar essa proliferação seria o estímulo das células do sistema imune, devido um possível efeito antioxidante ou anti-inflamatório (FERREIRA et al., 2016) do óleo essencial de *C. deliciosa* nessa concentração.

7 CONCLUSÃO

A extração do óleo essencial das folhas da espécie *C. deliciosa* Ten. apresentou um rendimento de $0,97\% \pm 0,04$.

Através da cromatografia gasosa foi possível identificar 12 compostos, sendo os majoritários: *N*-metil-antranilato de metila, γ -terpineno e Limoneno.

O óleo essencial de *C. deliciosa* demonstrou ação antifúngica contra todos os microrganismos testados, destacando-se com promissora ação frente *Cryptococcus neoformans*, *Cryptococcus gattii* e *Trichosporon asahii*.

Em relação à inibição da formação de biofilme, todas as concentrações utilizadas do óleo essencial de *C. deliciosa* foram capazes de interferir na produção de biofilme de *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* e *Trichosporon asahii*, podendo ser utilizado na prevenção da formação de biofilmes dessas espécies. Quanto à erradicação do biofilme formado, todas as concentrações utilizadas do óleo essencial também conseguiram reduzir significativamente a biomassa do biofilme de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis*, porém nenhuma concentração usada do óleo essencial foi capaz de erradicar o biofilme formado por *T. asahii*.

Nas concentrações testadas, o óleo essencial de *C. deliciosa* demonstrou fraca ação antioxidante frente à inibição do radical livre DPPH, bem como, não apresentou atividade satisfatória no poder de redução do íon ferro.

O óleo essencial de *C. deliciosa* não demonstrou citotoxicidade contra as células mononucleares humanas, podendo ser considerado um produto promissor para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp., *C. neoformans*, *C. gattii* e *T. asahii*.

Ademais, espera-se que esse trabalho possa contribuir para pesquisas futuras, para a produção de um possível medicamento ou fitoterápico que possa ser utilizado no tratamento de biofilmes ocasionados por *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *T. asahii*, e também na candidíase, criptococose e/ou tricosporonose.

REFERÊNCIAS

- AAZZA, S.; LYOUSSI, B.; MIGUEL, M. G. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, v. 16, n. 9, p. 7672-7690, 2011.
- ABDALLA, A. E.; ROOZEN, J. P. Effect of plant extracts on the oxidative stability of sunflower oil and emulsion. **Food Chemistry**, v. 64, n. 3, p. 323-329, 1999.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, p. 804, 2007.
- AGITA, A.; ALSAGAFF, M. T. Inflammation, immunity, and hypertension. **Acta Medica Indonesiana**, v. 49, n. 2, p. 158-165, 2017.
- AGUIAR, M. M. G. B. **Desenvolvimento de Novos Comprimidos Bucais de Nistatina para o Tratamento de Candidíase Oral**. 2007.146 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, 2007.
- AHMAD, S.; AI-MAHMEDD, M.; ZU, K. Characterization of *Trichosporon* species isolated from clinical specimens in Kuwait. **Journal of Medical Microbiology**, v. 54, p. 639- 646, n. 1, 2005.
- ALANGADEN, G. J. Nosocomial fungal infections: epidemiology, infection control, and prevention. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 25, p. 201–225, 2011.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 40, n. 9, p. 4168–4170, 2001.
- ALMEIDA, L. A. H. **Caracterização química de óleos essenciais em folhas de laranja azeda e mexeriqueira**. 2013. 67 p. Dissertação (mestrado em recursos genéticos vegetais) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, BA, 2013.
- AMINNEJAD, M. et al. Identification and Characterization of VNI/VNII and Novel VNII/VNIV Hybrids and Impact of Hybridization on Virulence and Antifungal Susceptibility Within the *C. neoformans/C. gattii* Species Complex. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p.1-28, 2016.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacoly**, v. 109, n. 3, p. 464-471, 2007.

ARAÚJO JÚNIOR, C. P. **Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais de frutas cítricas**. 2009. 80 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, 2009.

ASBAHANI, A. et al. Essential oils: From extraction to encapsulation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 483, n. 1-2, p. 220–243, 2015.

BADIEE, P.; ALBORZI, A. Susceptibility of clinical *Candida* species isolates to antifungal agents by E-test, Southern Iran: a five year study. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 3, n. 4, p.183-188, 2011.

BAIK, J. S. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils extracted from Korean endemic *Citrus* species. **Journal of Microbiology Biotechnology**, v. 18, n. 1, p. 74-79, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446–75, 2008.

BALTAZAR, L. M.; RIBEIRO, M. A. Primeiro isolamento ambiental de *Cryptococcus gattii* no Estado do Espírito Santo. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 5, p.449-453, 2008.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D, B. G. Candidíase. **Jornal brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 4, p. 629-43, 2010.

BASSETTI, M. *Trichosporon asahii* infection treated with caspofungin combined with liposomal amphotericin B. **Journal of Antimicrobial Chemother**, v. 54, n. 2, p. 575-577, 2004.

BASTIDAS, A. R. et al. Bronquiolitis respiratoria y neumonía descamativa asociada a fungemia por *Trichosporon asahii* en inmunocompetente: a propósito de un caso. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 24, n. 1, p. 89-96, 2016.

BENNETT, J. E. Antifungal Agents. In: BRUNTON, L. L; CHABNER, B. A; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman's: The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 12.ed. New York: McGraw-Hill Companies do Brasil, 2011.

BENTUBO, H. H.; GOMPERTZ, O. F. Effects of temperature and incubation time on their vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **SpringerPlus**, v. 3, p. 377-386, 2014.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the frap assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p.70-76, 1996.

BEYDA, N. D.; LEWIS, R. E.; GAREY, K. W. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 7-8, p. 1086-1096, 2012.

BICANIC, T.; HARRISON, T. S. Cryptococcal meningitis. **British Medical Bulletin**, v. 72, n. 1, p. 99-118, 2005.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M.; C., REZENDE, C. M. Óleos Essenciais no Brasil: Aspectos Gerais, Desenvolvimento e Perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BOGINO, P. C. et al. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, p. 15838–5859, 2013.

BONESI, M. et al. Comparative evaluation of petitgrain oils from six *Citrus* species alone and in combination as potential functional anti-radicals and antioxidant agents. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 152, n. 5, p. 986-993, 2018.

BRITO, L. L. **Atividade biológica do extrato de moléculas de *Euterpe oleracea* mart. (açai) sobre biofilme De *Candida parapsilosis* e *tropicalis***. 2017. 77 p. Dissertação (mestrado em Saúde do Adulto e da Criança) - Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, 2017.

BRITO, M.R.; SENNA-VALLE, L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 363-372, 2011.

BROOKS, G. F. et al. Multilocus digitação seqüência revela transmissão intrafamiliar e microevolutions de *Candida albicans* isolados do trato digestivo humano. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, p. 1810-1820, 2010.

BRUNETON, J. **Elementos de fitoquímica y de farmacognosia**. Editorial Acribia. Zaragoza, España, 1991.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

CACCIONI, D. R. L. et al. Relationship between volatile components of *citrus* essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 43, n. 1-2, p. 73-79, 1998.

CAMBOIM, E. K. A. et al. Prototecose: uma doença emergente. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 30, n. 1, p. 94-101, 2010.

CAMPELO, L. M. L. et al. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon Burn* (Rutaceae). **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 15, n. 4, p. 708-716, 2013.

CARRILO-MUÑOZ, A. J. et al. Antifungal agents: mode of action in yeast cells. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 19, n. 2, p. 130-139, 2006.

CAROVIĆ-STANKO, K. et al. Composition and antibacterial activities of essential oils of seven *Ocimum* taxa. **Food Chemistry**, v. 119, n. 1, p. 196-201, 2010.

CASAGRANDE, A. **Plantas medicinais e ritualísticas utilizadas pela comunidade do Morro da Cruz em Porto Alegre - RS**. 2009. 91 p. Trabalho de conclusão de curso (graduação em ciências biológicas) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2009.

CASTILHO, C. J. T. Infección fatal por *Trichosporon asahii* en una recién nacida de pretérmino. **Revista Chil Infección**, v. 25, n. 3, p. 213-215, 2009.

CASTRO, M. R. et al. Essential oil of *Psidium cattleianum* leaves: antioxidant and antifungal activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 242-250, 2015.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Screening da Atividade Antifúngica de Óleos Essenciais sobre Cepas de *Candida*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 3, p. 341-345, 2011.

CATALÁN, M.; MONTEJO, J. C. Antifúngicos sistêmicos: farmacodinamia y farmacocinética. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 23, n.1, p. 39-49, 2006.

CAVALCANTI, Y. W.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade Antifúngica de Três Óleos Essenciais Sobre Cepas de *Candida*. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, n. 52, p. 1-6, 2011.

CHAGAS-NETO, T. C.; CHAVES, G. M.; COLOMBO, A. L. Update on the genus *Trichosporon*. **Mycopathologia**, v. 166, n. 3, p. 121-132, 2008.

CHAVANT ,P. et al. A new device for rapid evaluation of biofilm formation potential by bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 68, n. 3, p. 605- 612, 2007.

CHAYAKULKEEREE, M.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 20, n. 3, p. 507-544, 2006.

CHEN, S.; MEYER, W.; SORRELL, T. *Cryptococcus gattii* infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 27, n. 4, p. 980–1024, 2014.

CHEN, S. et al. Epidemiology and hostand variety-dependent characteristics of infection due to *Cryptococcus neoformans* in Australia and New Zealand. **Clinical Infectious Disease**, v. 31, n. 2, p. 499–508, 2000.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoid by assay-guided comparison. **Plant Science**, v.163, p.1161-8, 2002.

CHOI, H. S. et al. Radical-scavenging activities of *citrus* essential oils and their components: detection using 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 9, p. 4156-4161, 2000.

CHOWDHARY A. et al. *Trichosporon asahii* as an emerging etiologic agent of disseminated trichosporonosis: A case report and an update. **Indian Journal Medical Microbiology**, v. 22, p. 16-22, 2004.

CIOLFI, F. **Potencial antimicrobiano de extratos e óleos Essenciais de vegetais não tradicionais sobre Patógenos de origem alimentar**. 2010. 71 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 3rded. **CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute**. Wayne, Pennsylvania, USA, 2008.

COLOMBO, A. L. et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283-312, 2013.

COLOMBO, A. L., PADOVAN, A. C.; CHAVES, G. M. Current knowledge of *Trichosporon* spp. and trichosporonosis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 24, n. 4, p. 682-700, 2011.

CONG, Lin et al. *In Vitro* Activity of berberine alone and in combination with antifungal drugs against planktonic forms and biofilms of *Trichosporon asahii*. **Mycopathologia**, v. 182, n. 9-10, p. 829-837, 2017.

CORDEIRO, R. A. et al. Farnesol inhibits planktonic cells and antifungal-tolerant biofilms of *Trichosporon asahii* and *Trichosporon inkin*. **Medical Mycology**, v. 00, p. 1-8, 2019.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 3, p. 183-205, 2001.

CORTÉS, J. A. L.; RUSSI, J. N. A. Echinocandins. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 28, n. 6, p. 529-536, 2011.

COSTA, J. F. O. et al. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 4, p. 502-505, 2010.

- COSTA, J. G. M. et al. Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p. 304-309, 2005.
- COSTA, M. et al. Correlation of in vitro itraconazole and fluconazole susceptibility with clinical outcome for patients with vulvovaginal candidiasis. **Mycopathologia**, v. 157, n. 1, p. 43-47, 2004.
- COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 5, p. 747–764, 2008.
- DAFERERA, D.J.; ZIOGAS, B.N.; POLISSIOI, M.G. The effectiveness of plant essential oil on the growth of *Botrytis cinérea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop Protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44. 2003.
- DAG, A.; CERIKÇIOGLU, N. Investigation of some virulence factors of *Trichosporon asahii* strains isolated from the clinical samples of hospitalized patients. **Mikrobioloji Bülteni**, v. 40, n. 3, p. 225–235, 2006.
- DE OLIVEIRA, A. R. et al. Determinação do tempo de hidrodestilação e do horário de colheita no óleo essencial de menta. **Horticultura Brasileira**, v. 30, n. 1, p.155-159, 2012.
- DE OLIVEIRA, D. H. et al. Antioxidant and antifungal activities of the flowers' essential oil of *Tagetes minuta*, (Z)-tagetone and thiotagetone. **Journal of Essential Oil Research**, v. 31, n. 2, p. 160-169, 2019.
- DENNING, D. W.; HOPE, W. W. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. **Trends in Microbiology**, v. 18, n. 5, p. 195–204, 2010.
- DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 1-7, 2011.
- DIAS, A. L. B. et al. Chemical composition and in vitro inhibitory effects of essential oils from fruit peel of three *Citrus* species and limonene on mycelial growth of *Sclerotinia sclerotiorum*. **Brazilian Journal of Biology**, n. AHEAD, p. 1-5, 2019.
- DI BONAVENTURA, G. et al. Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 10, p. 3269-3276, 2006.
- DINIZ, L. M.; FILHO, S. J. B. Estudo de 15 casos de *pedra* branca observados na Grande Vitória (Espírito Santo - Brasil) durante cinco anos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 80, n. 1, p. 49-52, 2005.
- DONLAN, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. **Emerging Infectious Diseases**, v. 8, n. 9, p. 881, 2002.

DO PRADO, A. C. et al. *Schinus molle* essential oil as a potential source of bioactive compounds: antifungal and antibacterial properties. **Journal of Applied Microbiology**, v. 126, n. 2, p. 516-522, 2019.

DORLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.2, p.167-193, 2002.

DUGO, G.; DI GIACOMO, A. **Citrus, The genus Citrus**. 1^a ed, Taylor and Francis: New York, p. 656, 2002.

DUGO, P. et al. Analytical characterization of mandarin (*Citrus deliciosa* Ten.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 26, n. 1, p. 34-46, 2011.

DUTRA, R. C. et al. Chemical composition and cytotoxicity activity of the essential oil of *Pterodon emarginatus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p. 971-978, 2012.

EBRIGHT, J. R., FAIRFAX, M. R., VAZQUEZ, J. A. *Trichosporon asahii*, a Non-*Candida* Yeast That Caused Fatal Septic Shock in a Patient without Cancer or Neutropenia. **Clinical Infectious Diseases**, v. 33, n. 5, e28–e30, 2001.

EL-HAWARY, S. S. et al. Chemical composition and biological activities of peels and leaves essential oils of four cultivars of *Citrus deliciosa* var. tangarina. **American Journal of Essential Oils and Natural Products**, v. 1, n. 2, p. 1-6, 2013.

ELLEPOLA, A. N. B.; SAMARANAYAKEL, L. Oral candidal infections and antimycotics. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 11, n. 2, p. 172-198, 2000.

ELLOUZE, I. et al. Season's Variation Impact on *Citrus aurantium* Leaves Essential Oil: Chemical Composition and Biological Activities. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 9, p. 173-180, 2012.

ESCOBAR, F. M. et al. Lack of cytotoxic and genotoxic effects of *Minthostachys verticillata* essential oil: studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3062-3067, 2012.

ESTEVAM, E. B. B. **Composição química e atividades biológicas do óleo essencial das folhas de *Citrus limonia* E *Citrus latifolia* e dos frutos verdes e folhas de *Protium ovatum***. 2017. 91 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Instituto federal de educação, ciência e tecnologia goiano, Rio Verde, GO, 2017.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed, v.1/2. São Paulo: Atheneu, 2010.

FERESIN, G. E. et. al. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan Province, Argentine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 78, n. 3, p. 103-107, 2001.

FERNANDEZ-ANDRADE, C. M. M. et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil and fractions extracted from the leaves of *Laurus nobilis* L.

cultivated in Southern Brazil. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 48, p. 865-871, 2016.

FERRAZ, R. P. C. et al. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.

FERREIRA, L. M. et al. Pomegranate seed oil nanoemulsions with selective antiglioma activity: optimization and evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and oxidative effects on mononuclear cells. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 2968-2977, 2016.

FIRMO, W. C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, n. especial, p. 1-6, 2011.

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

FOTI, M. C.; INGOLD, K. U. Mechanism of inhibition of lipid peroxidation by γ -terpinene, an unusual and potentially useful hydrocarbon antioxidant. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 9, p. 2758-2765, 2003.

FRIZZO, C. D.; LORENZO, D.; DELLACASSA, E. Composition and seasonal variation of the essential oils from two mandarin cultivars of southern Brazil. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 10, p. 3036-3041, 2004.

CAGGIANO, G. et al. *Candida* blood stream infections in Italy: changing epidemiology during 16 years of surveillance. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1-9, 2015.

GARCIA-EFFRON, G. et al. Novel FKS mutations associated with echinocandin resistance in *Candida* species. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 5, p. 2225-2227, 2010.

GARLET, Q.I. et al. Effect of (+)-dehydrofukinone on GABAA receptors and stress response in fish model. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 1, p. 1-9, 2016.

GIL-ALONSO, S. et al. Postantifungal Effect of Micafungin against the Species Complexes of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **PLoS One**, v. 10, n. 7, p. 1-11, 2015.

GILES, S. S. et al. Elucidating the pathogenesis of spores from the human fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 8, p. 3491-3500, 2009.

GIOLO, M. P.; SVIDZINSKI T. I. E. Physiopathogenesis, epidemiology and laboratory diagnosis of candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, n. 3, p. 225-234, 2010.

- GIRMENIA, C. et al. Invasive infections caused by *Trichosporon* species and *Geotrichum capitatum* in patients with hematological malignancies: a retrospective multicenter study from Italy and review of the literature. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 4, p. 1818-1828, 2005.
- GIWELI, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of *Satureja thymbra* growing wild in Libya. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 4836-4850, 2012.
- GLAHN, J. F.; MASON, J. R.; WOODS, D. R. Dimethyl anthranilate as a bird repellent in livestock feed. **Wildlife Society Bulletin**, v. 17, n. 3, p. 313-320, 1989.
- GOLDMAN, J. D.; VOLLMER, M. E.; LUKS, A. M. Cryptococcosis in the Immunocompetent Patient. **Respiratory Care**, v.55, n. 11, p. 1499-1503, 2010.
- GOMES, M. S. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero *Citrus* e de seus compostos majoritários**. 2014. 126 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG, 2014.
- GRINGS, M. B. **Estudo do comportamento de fases dos óleos essenciais de limão e bergamota em CO₂ supercrítico**. 2004. 106 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Regional Integrada, Erechim, RS, 2004.
- GUALCO, L. et al. Antifungal resistance in *Candida* spp. isolated in Italy between 2002 and 2005 from children and adults. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, n. 2, p. 179-184, 2007.
- GUILLARD, V. et al. Food preservative content reduction by controlling sorbic acid release from a superficial coating. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 10, n. 1, p. 108–115, 2009.
- GUIMARÃES, R. et al. Targeting excessive free radicals with peels and juices of *Citrus* fruits: grapefruit, lemon, lime and orange. **Food Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 99- 106, 2010.
- GUO, L. N. et al. Three-locus identification, genotyping and antifungal susceptibilities of medically important *Trichosporon* species from China. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 11, p. 3805-3811, 2011.
- HALCON, L; MILKUS, K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. **American Journal of Infection Control**, v. 32, n. 7, p. 402-408, 2004.
- HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.
- HANSON, K. E. et al. Drug Resistance in Cryptococcosis. **Antimicrobial Drug Resistance**, p. 1119–1140, 2017.

HARRIS, J. et al. *Cryptococcus gattii* in the United States: clinical aspects of infection with an emerging pathogen. **Clinical Infectious Diseases**, v. 53, n. 12, p. 1188-1195, 2011.

HASSANPOURAGHDAM, M. B. et al. γ -Terpinene and carvacrol rich volatile oil of *Satureja sahendica* Bornm. from Maragheh district in Northwest Iran. **Chemija**, v. 20, n. 3, p. 186-189, 2009.

HAZIROLAN, G. et al. Head-to-head comparison of inhibitory and fungicidal activities of fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole, and isavuconazole against clinical isolates of *Trichosporon asahii*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 10, p. 4841-4847, 2013.

HÉRITIER, V. N. V. et al. In vitro antifungal activity of essential oils extracted from some plants of Tangawisi® products on *Candida albicans*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 3, p. 01-05, 2017.

HODGSON, R.W. Horticultural varieties of *Citrus*. In: REUTHER, W., BATCHELOR, L.D., WEBBER, H.J. (Eds). **The Citrus industry**. VI Berkeley: University of California. p.431-591, 1967.

HUSSEIN, M. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops & Products**, v. 44, n. 1, p. 437–445, 2013.

ICHIKAWA, T. et al. Phenotypic switching and beta-N-acetylhexosaminidase activity of the pathogenic yeast *Trichosporon asahii*. **Microbiology and Immunology**, v. 48, n. 4, p. 237-242, 2004.

IDNURM, A. et al. Deciphering the model pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 753-764, 2005.

ITURRIETA-GONZÁLEZ, I. A. et al. Multiple species of *Trichosporon* produce biofilms highly resistant to triazoles and amphotericin B. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e109553, 2014.

JAAFARI, A. et al. Chemical composition and antitumor activity of different wild varieties of Moroccan thyme. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 477-491, 2007.

JAMUNA, S. et al. Potential antioxidant and cytoprotective effects of essential oil extracted from *Cymbopogon citratus* on OxLDL and H₂O₂ LDL induced Human Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC). **Food Science and Human Wellness**, v. 6, n. 2, p. 60-69, 2017.

KABIR, M. A.; AHMAD, Z. *Candida* Infections and Their Prevention. **ISRN Preventive Medicine**, v. 2013, p. 1-13, 2013.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 10, p. 813-829, 2003.

KATZUNG, G. B.; MASTERS, S. B.; TREVOR, J. A. **Basic and clinical pharmacology**: antifungal agents. 12^a edição. New York: McGraw-Hill, p. 849-855, 2012.

KATZUNG, B. G.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. 13^a edição, Brasil: McGraw Hill, 2017, 1202 p.

KHALIL, A. et al. Design, synthesis, and biological evaluation of aminothiazole derivatives against the fungal pathogens *Histoplasma capsulatum* and *Cryptococcus neoformans*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 3, p. 532–547, 2015.

KHAN, M. S. A.; AHMAD, L. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 416-423, 2012.

KHAN, M. S. A et al. Sub-MICs of *Carum copticum* and *Thymus vulgaris* influence virulence factors and biofilm formation in *Candida* spp. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 337, 2014.

KHAWCHAROENPORN, T.; APISARNTHANARAK, A.; MUNDY, L. M. Non-*neoformans* cryptococcal infections: a systematic review. **Infection**, v. 35, n. 2, p. 51-58, 2007.

KIDD, S. E. et al. A rare genotype of *Cryptococcus gattii* caused the cryptococcosis outbreak on Vancouver Island (British Columbia, Canada). **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 49, p. 17258-17263, 2004.

KONTOYIANNIS, D. P. et al. Trichosporonosis in a tertiary care cancer center: risk factors, changing spectrum and determinants of outcome. **Scandinavian Journal of Infectious Diseases**, v. 36, n. 8, p. 564-569, 2004.

KRCMERY, V. et al. Hematogenous trichosporonosis in cancer patients: report of 12 cases including 5 during prophylaxis with itraconazol. **Support Care Cancer**, v. 7, n. 1, p. 39-43, 1999.

KRISHNASAMY, L. et al. Molecular Mechanisms of Antifungal Drug Resistance in *Candida* Species. **Journal of Clinical & Diagnostic Research**, v. 12, n. 9, p. 1-6, 2018.

KUHN, D. M.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilms: antifungal resistance and emerging therapeutic options. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 5, n. 2, p. 186-197, 2004.

KURTZMAN, C. P.; FELL, J. W.; BOEKHOUT, T. **The yeasts, a taxonomic study**. 5^a edição, v. 3. Amsterdam: Elsevier, p. 1661-1662, 2011.

- KWON-CHUNG, K. J.; BENNETT, J. E. **Medicinal mycology**. 2ª edição. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 397-446, 1992.
- LACAZ, C. S. et al. **Tratado de micologia médica**. 9ª edição. São Paulo: editora Sarvier, p. 1104, 2002.
- LAZÉRA, M. et al. Criptococose. In: Coura JR. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013. v. 2, p. 1250-1260.
- LEMES, R. M. L. et al. Antifungal susceptibility profile of *Trichosporon* isolates: correlation between CLSI and estest methodologies. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 2, p. 310-315, 2010.
- LEWIS, R. Current Concepts in Antifungal Phasmacology. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 86, n. 8, p. 805–817, 2011.
- LI, G. X.; LIU, Z. Q. Unusual antioxidant behavior of α -and γ -terpinene in protecting methyl linoleate, DNA, and erythrocyte. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 3943-3948, 2009.
- LIAO, Y. et al. Epidemiology and outcome of *Trichosporon* fungemia: a review of 185 reported cases from 1975 to 2014. **Open Forum Infectious Diseases**, n. 4, v. 4, p. 1-10, 2015.
- LIMA, I. O. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LIN, X.; HEITMAN, J. The Biology of the *Cryptococcus neoformans* Species complex. **Annual Review of Microbiology**, v. 60, p. 69-105, 2006.
- LIU, T. B.; PERLIN, D. S.; XUE, C. Molecular mechanisms of cryptococcal meningitis. **Virulence**, v. 3, n. 2, p. 173- 181, 2012.
- LOIZZO, M. R. et al. Chemical profile and antioxidant properties of extracts and essential oils from *Citrusx limon* (L.) burm. Cv. Femminello comune. **Chemistry & Biodiversity**, v. 13, n. 5, p. 571-581, 2016.
- LÓPEZ, D.; VLAMAKIS, H.; KOLTER, R. Biofilms. Cold Spring Harb. **Perspect Biol**, v. 2, p. 1–11, 2010.
- LÓPEZ-MARTÍNEZ, R. Candidosis, a new challenge. **Clinics in Dermatology**, v. 28, n. 2, p.178-184, 2010.
- LOTA, M. et al. Chemical variability of peel and leaf essential oils of mandarins from *Citrus reticulata* Blanco. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 28, n. 1, p. 61-78, 2000.
- MACHADO, T. F.; BORGES, M. F.; BRUNO, L. M. **Aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos**. 1ª ed. Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, 32 p, 2011.

MADHAVAN, P.; JAMAL, F.; PEI, P. C. Laboratory isolation and identification of *Candida* species. **Journal of Applied Sciences**, v. 11, p. 2870-2877, 2011.

MALUF, S. W.; RIEGEL, M. **Citogenética Humana**. 1ª ed. ARTMED: Grupo A, 2011.

MANCARZ, G. F. F. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the leaves, bark and stems of *Liquidambar styraciflua* L.(Altingiaceae). **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 366-317, 2016.

MANUELE, M. G.; FERRARO, G.; ANESINI, C. Effect of *Tiliax viridis* flower extract on the proliferation of a lymphoma cell line and on normal murine lymphocytes: contribution of monoterpenes, especially limonene. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 11, p. 1520-1526, 2008.

MARCO, F. et al. Elucidating the origins of nosocomial infections with *Candida albicans* by DNA fingerprinting with the complex probe Ca3. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 37, p. 2817-2828, 1999.

MARTY, M. F. et al. Disseminated trichosporonosis caused by *Trichosporon loubieri*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 11, p. 5317-5320, 2003.

MASÁK, J. et al. *Pseudomonas* biofilms: possibilities of their control. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 89, p. 1-14, 2014.

MASON, J. R. et al. Field evaluation of dimethyl anthranilate as a bird repellent livestock feed additive. **The Journal of Wildlife Management**, v. 49, n. 3, p. 636-642, 1985.

MATSUE, K. et al. Breakthrough trichosporonosis in patients with hematologic malignancies receiving micafungin. **Clinical Infectious Disease**, v. 42, n. 6, p. 753-757, 2006.

MAUBON, D. et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: where are we now?. **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241-1255, 2014.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p. 119-128, 2013.

MAZIARZ, E. K.; PERFECT, J. R. Cryptococcosis. **Infectious Disease Clinics North America**, v. 30, n. 1, p. 179-206, 2016.

MAZZA, M. et al. *Cryptococcus gattii* in urban from cities in North-eastern Argentina. **Micoses**, v. 56, n. 6, p. 646-650, 2013.

MCMULLAN, B. J.; SORRELL, T. C.; CHEN, S. C. *Cryptococcus gattii* infections: contemporary aspects of epidemiology, clinical manifestations and management of infection. **Future Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1613-1631, 2013.

- MENICHINI, F. et al. Chemical composition and bioactivity of *Citrus medica* L. cv. Diamante essential oil obtained by hydrodistillation, cold-pressing and supercritical carbon dioxide extraction. **Natural Product Research**, v. 25, n. 8, p. 789-799, 2011.
- MENEZES, A. E. et al. Isolation and antifungal susceptibility testing of *trichosporon asahii* in Ceará, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, v. 54, n. 1, p. 121-125, 2012.
- MEZZARI, A.; FUENTEFRIA, A. M. **Micologia no laboratório clínico**. 1. ed. Barueri, SP: Manole; 2012. 200 p.
- MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants. A review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 5, p. 291-312, 2010.
- MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas**. 2010. 152 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade federal de Lavras, Lavras, MG, 2010.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, 2016.
- MODRZEWSKA, B.; KURNATOWSKI, P. Selected pathogenic characteristics of fungi from the genus *Candida*. **Annals of Parasitology**, v. 59, n. 2, p. 57-66, 2013.
- MONGE, R. A. et al. The MAP kinases signal transduction network in *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 152, p. 905-912, 2006.
- MONTAGNA, M. T. et al. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). **Infection**, v. 41, n. 3, p. 645-653, 2013.
- MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**, v. 27, n. 2, p. 1-14, 2009.
- MORAIS, R. M.; BARCELLOS, A.; REDAELLI, L. R. Insetos predadores em copas de *Citrus deliciosa* (Rutaceae) sob manejo orgânico no sul do Brasil. **Iheringia**, v. 96, n. 4, p. 419-424, 2006.
- MORACE, G.; PERDONI, F.; BORGHI, E. Antifungal drug resistance in *Candida* species. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 2, n. 4, p. 254-259, 2014.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Of Immunological Methods**, v. 65, v. 1-2, p. 55-63. 1983.
- MUKHERJEE, P. K. et al. Combination treatment of invasive fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 3, p. 196-194, 2005.

MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER M. A. **Microbiologia Médica**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

NAKAMURA, C. V. et al. *In vitro* activity of essential oil from *Ocimum gratissimum* L. against four *Candida* species. **Research in Microbiology**, v. 155, n. 7, p. 579-586, 2004.

NASCIMENTO, G. Araújo. et al. Efeitos Bradicárdicos e Antiarrítmicos do D-Limoneno em Ratos. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 113, n. 5, p. 925-932, 2019.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NIKOLAEV, Y. A.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm: “City of microbes” or an analogue of multicellular organism?. **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 125- 138, 2007.

O'TOOLE, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. **Journal of Visualized Experiments**, n. 47, p. e2437, 2011.

OKOH, O. O. **Chemical transformations and phytochemical studies of bioactive components from extracts of *Rosmarinus officinalis* L.** 2010. 198 f. Tese (doutorado em filosofia) – Faculdade de Ciências e Agricultura na Universidade de Fort Hare, Fort Hare, 2010.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702. 2009.

OLIVEIRA, J. C. **Tópicos em Micologia Médica**. ISBN 3ª edição, 2012. 255 p.

OLIVEIRA, M. B. **Extração, Caracterização e avaliação da atividade larvacida do óleo essencial do *Citrus Limon* Linneo (limão) frente ao mosquito *Aedes aegypti***. 2012. 77 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis, MA, 2012.

OLIVEIRO, C. A. et al. Susceptibilidad *in vitro* a anidula fungina en 100 cepas de especies de *Candida* aisladas prévio ala introducción de esta equinocandina en Chile. **Revista Chilena de Infectologia**, v. 28, n. 5, p. 399-403, 2011.

OLIVEIRA, V. M. et al. Quercetin and rutin as potential agents antifungal against *Cryptococcus* spp. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 4, p. 1029-1034, 2016.

OSTROSKY-ZEICHNER L. et al. An insight into the antifungal pipeline: selected new molecules and beyond. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 9, p. 719–727, 2010.

OYEDJI, O. A.; AFOLAYAN, A. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oil of the South African *Mentha longifolia*. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 1, p. 57-59, 2006.

OZKAYA-PARLAKAY, A. et al. *Trichosporon asahii* sepsis in a patient with pediatric malignancy. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 49, n. 1, p. 146–149, 2016.

PADOVAN, A. C. B. et al. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. **Fungal Genetics and Biology**, v. 133, p. 1-29, 2019.

PALMEIRA-DE-OLIVEIRA, A. et al. The anti-*Candida* activity of *Thymbra capitata* essential oil: effect upon pre-formed biofilm. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 379-383, 2012.

PANAGOPOULOU, P. et al. *Trichosporon asahii*: an unusual cause of invasive infection in neonates. **Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 21, n. 2, p. 169-170, 2002.

PARAMYTHIOTOU, E. et al. Invasive fungal infections in the ICU: how to approach, how to treat. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 1085-1119, 2014.

PATIL, R. P. et al. Antiaflatoxic and antioxidant activity of an essential oil from *Ageratum conyzoides* L. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 4, p. 608-614, 2010.

PEIXOTO, J. V. et al. Candidíase – uma revisão de literatura. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75-82, 2014.

PEREIRA, L. G. B. **Dossiê técnico: Minador-das-folhas-dos-citros e bicho furão: pragas de importância econômica da cultura do Citrus sp.** Fundação Centro Tecnológico de Minas Gerais, CETEC, 2008.

PERFECT, J. R. et al. Clinical practice guidelines for the management of cryptococcal disease: 2010 update by the Infectious Diseases Society of America. **Clinical Infectious Diseases**, v. 50, n. 3, p. 291-322, 2010.

PERVEEN, A.; QAISER, M. Pollen Flora of Pakistan -XIV. Rutaceae. **Pakistan Journal of Botany**, v. 37, n. 3, p. 495-501, 2005.

PFALLER, M. A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **The American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-S13, 2012.

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. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 48, n. 4, p. 1366-1377, 2010.

PFALLER, M. A. et al. Isavuconazole, micafungin, and 8 comparator antifungal agents' susceptibility profiles for common and uncommon opportunistic fungi collected in 2013: temporal analysis of antifungal drug resistance using CLSI species-specific clinical breakpoints and proposed epidemiological cutoff values. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 82, n. 4, p. 303-13, 2015.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistente public health problem. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 20, n. 1, p.133-163, 2007.

PFALLER, M. A.; DIEKEMA, D. J. Epidemiology of Invasive Mycoses in North America. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 36, n.1, p. 1-53, 2010.

PFALLER, M. A.; MCGGINNIS, M. R.; ANAISSIE, E. J. **Clinical Mycology**. 2. ed. New York: Churcill livingstone, 2009, 688 p.

PIGATTO, M. C.; UCHOA, F. T.; COSTA, T. D. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 90, n. 1, p. 86-94, 2009.

PINHEIRO, L. S. et al. Antifungal activity of the essential oil isolated from *Laurus nobilis* L. against *Cryptococcus neoformans* strains. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, n. 05, p. 115-118, 2017.

PIRES, R.H. et al. Anticandidal efficacy of cinnamon oil against planktonic and biofilm cultures of *Candida parapsilosis* and *Candida orthopsilosis*. **Mycopathologia**, v. 172, n. 6, p. 453-464, 2011.

PONTES, S. V. Z. et al. Atividade Antifúngica de óleos essenciais sobre Cepas de *Trichosporon asahii* e *Trichosporon inkin*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 8, n. 2, p.125-134, 2004.

PRASHAR A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (*Cymbopogon martinii*) on *Saccharomyces cerevisiae*. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 569-575, 2003.

PRUDENTE, R. C. C.; MOURA, R. B. Evidências científicas para a indicação popular de algumas espécies da família Rutaceae no tratamento de doenças respiratórias na região Sudeste do Brasil. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 25, n. 1, p. 1-8, 2013.

QUEIROZ, J. P. A. et al. Criptococose – uma revisão bibliográfica. **Acta Veterinária Brasileira**, v. 2, p. 32-8, 2008.

QUINDÓS, G. Epidemiology of candidaemia and invasive candidiasis. A changing face. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 31, n. 1, p. 42-48, 2014.

RAJENDRAN, R. et al. Hydrolytic enzyme production is associated with *Candida albicans* biofilm formation from patients with type 1 diabetes. **Mycopathologia**, v. 170, n. 4, p. 229-235, 2010.

RAJKOWSKA, K.; NOWICKA-KRAWCZYK, P.; KUNICKA-STYCZYŃSKA, A. Effect of Clove and Thyme essential oils on biofilm formation and the oil distribution in yeast cells. **Molecules**, v. 24, n. 10, p. 1954, 2019.

RAMALHO, T. R. et al. Gamma-terpinene modulation of LPS-stimulated macrophages is dependent on the PGE2/IL-10 axis. **Planta Medica**, v. 82, n. 15, p. 1341-1345, 2016.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, p. 768.

RANGEL, M. L. et al. In vitro effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on *Candida* spp. involved in oral infections. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2018, p. 1-13, 2018.

RASHID, S. et al. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. **Food Chemistry**, v. 138, n. 1, p. 693-700, 2013.

RAUT, J. S, KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, n. 1, p. 250-264, 2014.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. Phytochemicals as inhibitors of *Candida* biofilm. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 27, p. 4111-4134, 2016.

RIBAS, R. C.; BAEZA, L. C.; RIBEIRO, F. H. M.. Isolation of *Cryptococcus* spp. in excrements of pigeons (*Columba* sp.) in the Maringa city, PR, Brazil. **Arquivos de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 15, p.45-50, 2011.

REFOJO, N. et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* from trunk hollows of living trees in Buenos Aires City, Argentina. **Medical Mycology**, v. 47, n. 2, p. 1-8, 2008.

REIMÃO, J. Q. et al. Isolation of *Cryptococcus neoformans* from hollows of living trees in the city of Alfenas, MG, Brazil. **Mycoses**, v. 50, p. 261-264, 2007.

RAMAGE, G. et al. *Candida* biofilms: an update. **Eukaryotic cell**, v. 4, n. 4, p. 633-638, 2005.

ROBERTO, D. et al. Antioxidant activity of limonene on normal murine lymphocytes: relation to H₂O₂ modulation and cell proliferation. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 106, n. 1, p. 38-44, 2010.

RODRIGUES, M. E. et al. Novel strategies to fight *Candida* species infection. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 4, p. 594-606, 2016.

ROOS, V. C. et al. Ethnopharmacological study of medicinal plants and their possible drug interactions in two cities of the South of Brazil. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 5, p. 4145-4173, 2019.

- RUAN, S. Y.; CHIEN, J. Y.; HSUEH, P. R. Invasive trichosporonosis caused by *Trichosporon asahii* and other unusual *Trichosporon* species at a medical center in Taiwan. **Clinical Infectious Disease**, v. 49, n. 1, p. 11–17, 2009.
- RUIZ-PÉREZ, N. J. et al. Antimycotic activity and genotoxic evaluation of *Citrus sinensis* and *Citrus latifolia* essential oils. **Scientific reports**, v. 6, n. 25371, p. 1-9, 2016.
- SAIDANI, M.; DHIFI, W.; MARZOUK, B. Lipid evaluation of some Tunisian *citrus* seeds. **Journal of Food Lipids**, v. 1, n. 1, p. 242–250, 2004.
- SALIE, F.; EAGLES, P. F. K.; LENS, H. M.J. Preliminary antimicrobial screening of four South African Asteraceae species. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 52, n. 1, p. 27-33, 1996.
- SANCHEZ, A.; LARSEN, R. Emerging fungal pathogens in pulmonary disease. **Current Opinion in Pulmonary Medicine**, v. 13, n. 3, p. 199-204, 2007.
- SANCHIS, M. et al. Voriconazole minimum inhibitory concentrations are predictive of treatment outcome in experimental murine infections by *Candida glabrata*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 47, n.4, p. 286-288, 2015.
- SANTANA, D. P. et al. Novas abordagens sobre os fatores de virulência de *Candida albicans*. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 12, n. 2, p. 229-233, 2013.
- SANTOS, A. O. et al. Atividade antibacteriana e antioxidante de óleos essenciais cítricos com potencialidade para inclusão como aditivos em alimentos. **Caderno de Ciências Agrárias**, v. 8, n. 3, p. 15-21, 2016.
- SARIGUZEL, M. F. et al. Investigation of the relationship between virulence factors and genotype of *Candida* spp. isolated from blood cultures. **The Journal of Infection in Developing Countries**, v. 9, n. 8, p. 857-864, 2015.
- SATISHCHANDRA, P. et al. Cryptococcal meningitis: clinical, diagnostic and therapeutic overviews. **Neurology India**, v. 55, n. 3, p. 226-232, 2007.
- SATO, K.; KRIST, S.; BUCHBAUER, G. Antimicrobial effect of vapours of geraniol, (R)-(-)-linalool, terpineol, γ -terpinene and 1, 8-cineole on airborne microbes using an airwasher. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 5, p. 435-437, 2007.
- SAUER, K. The genomics and proteomics of biofilm formation. **Genome Biology**, v. 4, p. 219-223, 2003.
- SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.
- SCORZONI, L. et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. **PloS one**, v. 8, n. 3, 2013.

SENEVIRATNE, C. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Biofilm lifestyle of *Candida*: a mini review. **Oral Diseases**, v. 14, p. 582-590, 2008.

SHANG, S. T., YANG, Y. S., PENG, M. Y. Nosocomial *Trichosporon asahii* Fungemia in a Patient with Secondary Hemochromatosis: A Rare Case Report. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 43, n. 1, p. 77-80, 2010.

SILVA, C. V. et al. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2071-2075, 2008.

SILVA, C. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de duas espécies de *Rutaceae* do Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 355-360, 2010.

SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis perniciosa*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, v. 32, n. 2, p. 143-145. 2007.

SILVA, R. B. O. et al. Genetic diversity and antifungal susceptibility testing of *Trichosporon asahii* isolated of Intensive Care Units patients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 585-592, 2008.

SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S. Óleos Essenciais: **A Fonte dos Aromas e Fragrâncias**. In: Adelaide Maria de Souza Antunes. (Org.). Setores da Indústria Química Orgânica. 1ed. Rio de Janeiro: E-papersv, p. 145-160, 2007.

SILVESTRE JUNIOR, A. M., MIRANDA, A. B. P.; CAMARGO, Z. P. *Trichosporon* species isolated from the perigenital region, urine and catheters of a brazilian population. **Brazilian Journal of Microbiology**, n. 41, n. 3, p.628–634, 2010.

SIMAS, D. L. R. et al. Characterization of essential oils of *citrus* fruits. **Citrus Research & Technology**, v. 36, n. 1, p. 15-26, 2017.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, p. 222- 595, 2010.

SINGH, G. et al. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 9, p. 1650-1661, 2007.

SINGH, P. et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1734-1740, 2010.

SIQUI, A. C. et al. S. Óleos essenciais – potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 16, n. 1, p. 38-43, 2000.

SOOD, S. et al. Urinary tract infection by *Trichosporon asahii*. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 24, n. 4, p.294–296, 2006.

SOOKTO, T. et al. *In vitro* effects of *Salvia officinalis* L. essential oil on *Candida albicans*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 5, p. 376-380, 2013.

SORRELL, T. C. *Cryptococcus neoformans* variety *gattii*. **Medical Mycology**, v. 39, n. 2, p.155–168, 2001.

SOUZA, M. E. et al. *Melaleuca alternifolia* nanoparticles against *Candida* species biofilms. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 125-132, 2017.

STEWART, P. S.; FRANKLIN, M. J. Physiological heterogeneity in biofilms. **Nature Reviews Microbiology**, v. 6, n. 3, p. 199-210, 2008.

SUBRAMANIAN, S.; MATHAI, D. Clinical manifestations and management of cryptococcal infection. **Journal of Postgraduate Medicine**, v. 51, n. 5, p. 21, 2005.

SUN, F. et al. Biofilm-associated infections: antibiotic resistance and novel therapeutic strategies. **Future Microbiology**, v. 8, n. 7, p. 877-886, 2013.

SUN, W. et al. *Trichosporon asahii* causing nosocomial urinary tract infections in intensive care unit patients: genotypes, virulence factors and anti-fungal susceptibility testing. **Journal of Medical Microbiology**, v. 61, n. 12, p. 1750-1757, 2012.

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 - Matérias)- Instituto de Pesquisas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

TAFF, H. T. et al. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. **Future Microbiology**, v. 8, n. 10, p. 1325-1337, 2013.

TAO, N. G. et al. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Citrus reticulata*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 45, n. 3, p. 437-438, 2009.

TAVARES W. **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**. 3ª edição. São Paulo: Atheneu, p. 869-886, 2001.

TEIXEIRA, J. P. F.; MARQUES, M. O. M.; PIO, R. M. Caracterização dos óleos essenciais em frutos de nove genótipos de tangerina. **Citrus Research & Technology**, v.35, n.1, p.1-10, 2014.

TOBOUTI, P. L. et al. Influence of melaleuca and copaiba oils on *Candida albicans* adhesion. **Gerodontology**, v. 33, n. 3, p. 380-385, 2016.

TONELLI, M.; GEROMEL, M. R.; FAZIO, M. L. S. Ação antimicrobiana de óleos essenciais de sucupira branca (*Pterodon emarginatus*); folhas de pêssigo (*Prunus persica*); bagas de junipero (*Juniperus communis*); rosa de damasco (*Rosa*

damascena) e petitgrain mandarina (*Citrus deliciosa*). **Higiene Alimentar**, v. 32, n. 278/279, p. 69-73, 2018.

TSUI, C.; KONG, E.F.; JABRA-RIZK, M.A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. **Pathogens and Disease**, v. 74, n. 4, p. ftw018, 2016.

TUNDIS, R. et al. *Poncirus trifoliata* (L.) Raf.: Chemical composition, antioxidant properties and hypoglycaemic activity via the inhibition of α -amylase and α -glucosidase enzymes. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 477-485, 2016.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Mentha piperita* oil in liquid and vapour phase against food spoiling microorganisms. **Food Control**, v. 22, n. 11, p. 1707-1714, 2011.

ÜNAL, M. Ü. et al. Research on antifungal and inhibitory effects of DL-limonene on some yeasts. **Turkish Journal of Agriculture and Forestry**, v. 36, n. 5, p. 576-582, 2012.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: CREE, I. A. et al. **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**. 2 ed. Humana Press, 2011. p. 237-245.

VASHISHTHA, V. M.; MITTAL, A.; GARG, A. A fatal outbreak of *Trichosporon asahii* Sepsis in a neonatal intensive care unit. **Indian Pediatrics**, v. 49, n. 9, p. 745-747, 2012.

VALLADARES, G. J. C. et al. Infección por *Trichosporon asahii*. **Anales Médicos**, v. 63, n. 2, p. 138-141, 2018.

VENDRUSCOLO, G. S.; RATES, S. M. K.; MENTZ, L. A. Dados químicos e farmacológicos sobre as plantas utilizadas como medicinais pela comunidade do bairro Ponta Grossa, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 361-372, 2005.

VENTO, S.; CAINELLI, F. Infections in patients whit câncer undergoing chemotherapy: prevention and treatment. **The Lancet Oncology**, v. 4, p. 595-604, 2003.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 12, p. 1130-1138, 2008.

VOELZ, K.; MAY, R.C. Cryptococcal Interactions with the Host Immune System. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 6, p. 835-846, 2010.

WAIKEDRE, J. et al. Antifungal activity of the essential oils of *Callitris neocaledonica* and *C. sulcata* heartwood (Cupressaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 9, n. 3, p. 644-653, 2012.

WAIKEDRE, J. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from New Caledonian *Citrus macroptera* and *Citrus hystrix*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 871-877, 2010.

WARNOCK, D. W. Trends in the epidemiology invasive fungal infections. **Japanese Journal of Medical Mycology**, v. 48, p. 1-12, 2007.

WERTHER, K. et al. *Cryptococcus gattii* and *Cryptococcus albidus* in Captive Domestic Pigeon (*Columba livia*). **Brazilian Journal Veterinary Pathology**, v. 4, n. 3, p.247-249, 2011.

WEI, A.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant activities and volatile constituents of various essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 5, p. 1737-1742, 2007.

WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T. A. **Farmacologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2016, 670 p.

WHALEY, S. G. et al. Azole antifungal resistance in *Candida albicans* and emerging non-*albicans Candida* species. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 2173, 2017.

WHIBLEY, N.; GAFFEN, S. L. Beyond *Candida albicans*: Mechanisms of immunity to non-*albicans Candida* species. **Cytokine**, v. 76, n. 1, p. 42-52, 2015.

WILLIAMS, D; LEWIS, M. Pathogenesis and treatment of oral candidosis. **Journal of Oral Microbiology**, v. 3, n. 1, p. 1-8, 2011.

WISPLINGHOFF H. et al. Nosocomial bloodstream infections due to *Candida* spp. in the USA: species distribution, clinical features and antifungal susceptibilities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 43, n. 1, p. 78-81, 2014.

WOLF, D. G. et al. Multidrug-resistant *Trichosporon asahii* infection of nongranulocytopenic patients in three intensive care units. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 12, p. 4420-4425, 2001.

XING, Y. et al. Antifungal activities of clove oil against *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus flavus* and *Penicillium citrinum* in vitro and in wounded fruit test. **Journal of Food Safety**, v. 32, n. 1, p. 84-93, 2012.

YAMAGATA, E. et al. Experimental model of progressive disseminated trichosporonosis in mice with latent trichosporonemia. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 38, n. 9, p. 3260-3266, 2000.

YANG, S. et al. *In vitro* interactions between non-steroidal anti-inflammatory drugs and antifungal agents against planktonic and biofilm forms of *Trichosporon asahii*. **PloS one**, v. 11, n. 6, p. e0157047, 2016.

YONG, A. M. Y. et al. Disseminated Cutaneous Trichosporonosis in an Adult Bone Marrow Transplant Patient. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 8, n. 3, p. 192-194, 2017.

ZAITS, C. et al. **Compêndio de micologia médica**. 2. Ed. (Reimpressa) Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 434 p.

ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Avaliação da cito-genotoxicidade de compostos na sua forma livre e nanoestruturada em células mononucleadas de sangue periférico

Pesquisador: Michele Rorato Sagrillo

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 3

CAAE: 31211214.4.0000.5306

Instituição Proponente: Centro Universitário Franciscano - UNIFRA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.591.719

Apresentação do Projeto:

As Células Mononucleadas de Sangue Periférico (CMSP) têm sido aplicadas por décadas como biomarcadoras de efeitos cito e genotóxicos, entre outros. Por serem abundantes na circulação sanguínea, são expostas a qualquer agente mutagênico e são capazes de refletir danos recentes. As CMSP semeadas em cultura tornaram-se o modelo in vitro bastante promissor para diversos estudos, o que ressalta a utilidade desta linhagem

celular em estudos de cito-genotoxicidade. Neste contexto, o objetivo desta pesquisa é avaliar os potenciais efeitos cito-genotóxicos dos sistemas Nanoestruturados em cultura de células mononucleadas de sangue periférico, através da viabilidade celular, peroxidação lipídica, presença de instabilidades cromossômicas, índice mitótico e alterações metanucleares.

A metodologia proposta para a realização das avaliações de cito-genotoxicidade será viabilidade celular, pela técnica do MTT, peroxidação lipídica (TBARS), catalase, presença de instabilidades cromossômicas, índice mitótico e alterações metanucleares, hemólise e indicadores de estresse oxidativo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Neste contexto, o objetivo deste estudo é avaliar os potenciais efeitos cito-genotóxicos de

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Reitoria - Campus I - 6º andar
Bairro: Centro **CEP:** 97.010-032
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-1200 **Fax:** (55)3222-6484 **E-mail:** cep@unifra.br

ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (continuação)



Continuação do Parecer: 2.591.719

compostos com potenciais efeitos farmacológicos, tanto em sua forma livre quanto em sistemas nanoestruturados em CMSP em cultura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não se aplica.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente emenda vem solicitar uma extensão do cronograma até 3de abril de 2020.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto apresenta todos os Termos e documentos preconizados pela Resolução CNS nº466/12.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A solicitação da ementa está aprovada. No entanto os pesquisadores deverão apresentar relatório parcial em março de 2019.

Considerações Finais a critério do CEP:

Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê. O pesquisador deve apresentar relatório parcial da pesquisa, ao CEP/UNIFRA, via Plataforma Brasil, no mês de março/2019, conforme determinação do CONEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_110615_8_E2.pdf	03/04/2018 10:51:04		Aceito
Folha de Rosto	MicheleS 001.jpg	19/05/2014 17:01:31		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto CEP.docx	15/05/2014 10:32:09		Aceito
Outros	TERMO DE CONFIDENCIALIDADE.pdf	14/05/2014 23:22:01		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Reitoria - Campus I - 6º andar
Bairro: Centro **CEP:** 97.010-032
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-1200 **Fax:** (55)3222-6484 **E-mail:** cep@unifra.br

ANEXO A – APROVAÇÃO DO TRABALHO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (continuação)



Continuação do Parecer: 2.591.719

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SANTA MARIA, 10 de Abril de 2018

Assinado por:

**Maria do Carmo dos Santos Araujo
(Coordenador)**

Endereço: R. dos Andrada, 1614 - Prédio da Reitoria - Campus I - 6º andar
Bairro: Centro **CEP:** 97.010-032
UF: RS **Município:** SANTA MARIA
Telefone: (55)3220-1200 **Fax:** (55)3222-6484 **E-mail:** cep@unifra.br