

## Efeito inibitório de di-hidrojasmona frente cepas de *Candida* spp. fluconazol resistentes

Inhibitory effect of di-hydrojasmonone against strains of *Candida* spp. fluconazole resistant

Efecto inhibidor de la dihidrojasmona contra *Candida* spp. resistente al fluconazol

Recebido: 10/11/2021 | Revisado: 17/11/2021 | Aceito: 19/11/2021 | Publicado: 29/11/2021

### **Luanna de Oliveira e Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9479-1733>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [luanna.lima@academico.ufpb.br](mailto:luanna.lima@academico.ufpb.br)

### **Larissa Alves Silva**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5073-7033>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [larissa.silva@academico.ufpb.br](mailto:larissa.silva@academico.ufpb.br)

### **Mariana Cavalcante Fonseca**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2889-8321>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [marianacavalcantef@gmail.com](mailto:marianacavalcantef@gmail.com)

### **Hermes Diniz-Neto**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2878-1737>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [hermes.dn@lft.ufpb.br](mailto:hermes.dn@lft.ufpb.br)

### **Edeltrudes de Oliveira Lima**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [edelolima@yahoo.com.br](mailto:edelolima@yahoo.com.br)

### **José Maria Barbosa Filho**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9567-4096>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [jbarbosa@lft.ufpb.br](mailto:jbarbosa@lft.ufpb.br)

### **Josean Fechine Tavares**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0293-2605>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [josean@lft.ufpb.br](mailto:josean@lft.ufpb.br)

### **Walicyranison Plínio da Silva-Rocha**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0639-2781>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [wps@academico.ufpb.br](mailto:wps@academico.ufpb.br)

### **Felipe Queiroga Sarmento Guerra**

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2057-4821>

Universidade Federal da Paraíba, Brasil

E-mail: [fqsg@academico.ufpb.br](mailto:fqsg@academico.ufpb.br)

### **Resumo**

**Introdução:** A candidíase está relacionada a uma grande variedade de manifestações clínicas que se expressam desde infecções na pele e mucosas à infecção sistêmica. Sendo esta última associada a uma alta taxa de mortalidade global, variando de 36% a 63% em diferentes grupos de pacientes. A terapêutica de infecções fúngicas invasivas é limitada pois há apenas três classes de fármacos convencionais utilizados. Diante deste cenário, estratégias de uso racional dos antifúngicos e busca de novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias. **Objetivo:** Avaliar a atividade antifúngica in vitro do monoterpene di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* fluconazol resistentes. **Metodologia:** As concentrações inibitórias mínimas (CIM) e fungicida mínima (CFM) foram determinadas pelo método de microdiluição. Posteriormente foi observado se a ação antifúngica de di-hidrojasmona ocorre via parede celular (ensaio com sorbitol) ou via membrana (ensaio com ergosterol exógeno). **Resultados:** A di-hidrojasmona apresentou uma CIM entre 128 - 256 µg/mL e a CFM teve os mesmos valores de CIM, respectivamente. No ensaio com ergosterol exógeno, a CIM da di-hidrojasmona aumentou na presença do ergosterol exógeno sugerindo que o mecanismo de ação do monoterpene ocorre a partir de sua ligação ao ergosterol presente na membrana. Não houve alteração frente ao uso do sorbitol. **Conclusão:** Baseado nestes resultados, o presente estudo demonstra que di-hidrojasmona possui forte atividade antifúngica e sugere que esta atividade esteja relacionada a sua ligação ao ergosterol da membrana fúngica. Logo, di-hidrojasmona demonstra ser um promissor bioproduto na busca de alternativas para o tratamento das candidíases.

**Palavras-chave:** Candidíase; Monoterpene; Produtos naturais; Antifúngico.

## Abstract

**Introduction:** Candidiasis is related to a wide variety of clinical manifestations that are expressed from skin and mucosal infections to systemic infection. The latter being associated with a high global mortality rate, ranging from 36% to 63% in different groups of patients. The therapy of invasive fungal infections is limited, as there are only three classes of conventional drugs used. In this scenario, strategies for the rational use of antifungal agents and the search for new therapeutic alternatives are necessary. **Objective:** To evaluate the in vitro antifungal activity of the monoterpene dihydrojasmane against fluconazole resistant strains of *Candida albicans* and *Candida parapsilosis*. **Methodology:** The minimal inhibitory (MIC) and minimal fungicidal (MFC) concentrations were determined by the microdilution method. It was later observed whether the antifungal action of dihydrojasmane occurs via the cell wall (sorbitol assay) or via membrane (exogenous ergosterol assay). **Results:** Dihydrojasmane had a MIC between 128 - 256 µg/mL and MFC had the same MIC values, respectively. In the assay with exogenous ergosterol, the MIC of dihydrojasmane increased in the presence of exogenous ergosterol, suggesting that the mechanism of action of monoterpene occurs through its binding to ergosterol present in the membrane. There was no change regarding the use of sorbitol. **Conclusion:** Based on these results, the present study demonstrates that dihydrojasmane has strong antifungal activity, and suggests that this activity is related to its binding to ergosterol in the fungal membrane. Therefore, dihydrojasmane proves to be a promising bioproduct in the search for alternatives for the treatment of candidiasis.

**Keywords:** Candidiasis; Monoterpene; Natural products; Antifungal.

## Resumen

**Introducción:** La candidiasis se relaciona con una amplia variedad de manifestaciones clínicas que se expresan desde infecciones cutáneas y mucosas hasta infecciones sistémicas. Esta última se asocia a una alta tasa de mortalidad global, que oscila entre el 36% y el 63% en diferentes grupos de pacientes. La terapia de las infecciones fúngicas invasivas es limitada ya que solo se utilizan tres clases de fármacos convencionales. En este escenario, son necesarias estrategias para el uso racional de agentes antifúngicos y la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas. **Objetivo:** Evaluar la actividad antifúngica in vitro de la monoterpene dihidrojasmona frente a cepas de *Candida albicans* y *Candida parapsilosis* resistentes al fluconazol. **Metodología:** Las concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) y mínimas fungicidas (CMF) se determinaron mediante el método de microdilución. Posteriormente se observó si la acción antifúngica de la dihidrojasmona se produce a través de la pared celular (ensayo de sorbitol) o mediante la membrana (ensayo de ergosterol exógeno). **Resultados:** La dihidrojasmona tuvo una CMI entre 128 - 256 µg / mL y CMF tuvo los mismos valores de CMI, respectivamente. En el ensayo con ergosterol exógeno, la CMI de dihidrojasmona aumentó en presencia de ergosterol exógeno, lo que sugiere que el mecanismo de acción del monoterpene se produce a través de su unión al ergosterol presente en la membrana. No hubo cambios con respecto al uso de sorbitol. **Conclusión:** Con base en estos resultados, el presente estudio demuestra que la dihidrojasmona tiene una fuerte actividad antifúngica y sugiere que esta actividad está relacionada con su unión al ergosterol en la membrana fúngica. Por tanto, la dihidrojasmona resulta ser un bioproducto prometedor en la búsqueda de alternativas para el tratamiento de la candidiasis.

**Palabras clave:** Candidiasis; Monoterpene; Productos naturales; Antifúngico.

## 1. Introdução

A candidíase está relacionada a uma grande variedade de manifestações clínicas que se expressam desde infecções na pele e mucosas à infecção sistêmica. Sendo esta última associada a uma alta taxa de mortalidade global, variando de 36% a 63% em diferentes grupos de pacientes. As espécies do gênero *Candida* mais isoladas são *C. albicans*, *C. glabrata*, complexo *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *C. krusei* (Vieira & Santos, 2017).

Estas enfermidades são oportunistas, causando doenças graves, principalmente, em pacientes imunossuprimidos, tais como aqueles com neoplasias, transplantados ou mesmo os que se encontram em unidades de terapia intensiva (UTI), cenário agravado no último ano pela pandemia Covid-19 (Farias et al., 2021; Lass-Flörl et al., 2021).

A terapêutica de infecções fúngicas invasivas é limitada, pois há apenas três classes de fármacos convencionais utilizados. Dentre os antifúngicos utilizados na terapêutica de candidíases invasivas destacam-se os azólicos, como fluconazol, derivados poliênicos, como anfotericina B, e do grupo das equinocandinas, a caspofungina (Musiol & Kowalczyk, 2012).

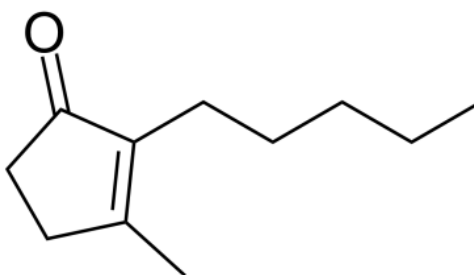
Entretanto, todas possuem inconvenientes, com duração extensa do tratamento, toxicidade, além do custo, se tornam obstáculos na adesão do paciente (Antinori et al., 2016). Adicionalmente, observa-se um aumento na incidência de cepas multirresistentes, tais como *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Chang et al., 2017).

Diante deste cenário, estratégias de uso racional dos antifúngicos e busca de novas alternativas terapêuticas se fazem necessárias. Os produtos naturais e seus derivados são reconhecidamente importantes na pesquisa farmacológica. Devido sua abundância, fácil manuseio, e boa capacidade biossintética, estes são uma importante fonte para o desenvolvimento de novas moléculas, de maior eficácia e segurança. Nos últimos anos esses produtos e seus derivados têm sido berço para esses estudos, resultando em novas opções promissoras de tratamento, incluindo antifúngicos (Scorzoni et al., 2016).

Dentre os derivados destacam-se os terpenos, que são metabólitos secundários presentes abundantemente na natureza, e que compreendem substâncias de importante função nos processos patológicos (Silva Filho et al., 2017)

Di-hidrojasmona é um monoterpreno de peso molecular (PM) de 166,26 g/mol, extraído da casca de *Koelreuteria paniculata*, uma árvore da família *Sapindaceae*, e também das flores de *Carissa spinarum* L., pertencente à família *Apocynaceae*, (Figura 1) muito utilizado na indústria de cosméticos como flavorizante, devido seu odor agradável. Existe relato na literatura da sua atividade antifúngica frente espécies de dermatófitos (Pinto, 2019) no entanto não há estudos de sua ação frente as leveduras.

**Figura 1:** Estrutura química de di-hidrojasmona.



Fonte: Reproduzido de NCBI (2021).

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* da di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* fluconazol resistentes.

## 2. Metodologia

### Microrganismos

Para os ensaios de atividade antifúngica, foram utilizadas a *C. albicans* ATCC 76485 (*American Type Culture Collection*) e cepas clínicas de *C. albicans* LM-587, *C. albicans* LM-616, bem como cepa padrão *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. parapsilosis* LM-439, *C. parapsilosis* LM-5770, *C. parapsilosis* LM-55117. Estas possuem o respectivo perfil de sensibilidade, exposto no Quadro 1 (CLSI, 2008). Assim, segundo critério estabelecidos pelo documento M27A2, todas as cepas ensaiadas são resistentes ao fluconazol.

**Quadro 1:** Perfil de sensibilidade das cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*

Cepas	Anfotericina B	Fluconazol	
	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )		
<i>C. albicans</i>	ATCC 76485	0,25 (S)	32 (R)
	LM-616	0,25 (S)	64 (R)
	LM-587	0,25 (S)	16 (R)
<i>C. parapsilosis</i>	ATCC 22019	0,25 (S)	16 (R)
	LM-439	0,50 (S)	32 (R)
	LM-5770	0,25 (S)	64 (R)
	LM-55117	0,50 (S)	32 (R)

Legenda: (S): Sensível; (I): Sensibilidade intermediária; (R): Resistente.

Fonte: Autores.

## Reagentes

Os meios de cultura utilizados foram: Agar Sabouraud dextrose (ASD), Agar Arroz e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, adquiridos via Sigma-aldrich®. Todos foram preparados conforme orientações do fabricante. A di-hidrojasmona, antifúngico anfotericina B, ergosterol, dimetilsulfóxido (DMSO) e tween 80 também foram oriundos da Sigma-Aldrich® Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O sorbitol foi adquirido da VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ.

## Inóculo

As suspensões foram preparadas a partir de culturas recém semeadas em ASD e incubadas a 35 °C durante 48 horas. Após a incubação, foi transferido aproximadamente 5 colônias (com uma alça estéril) para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0,85 %), e agitadas durante 15 segundos com o auxílio de um aparelho vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil). A turbidez do inóculo final foi padronizada com o tubo de 0,5 na escala de McFarland. A concentração final obtida foi de  $1,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) (CLSI, 2008; Svetaz et al., 2010).

## Determinação da Concentração Inibitória Mínima e (CIM) e da Concentração Fungicida Mínima CFM

A CIM de di-hidrojasmona, bem como do antifúngico anfotericina B foi determinada por meio da técnica de microdiluição em microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®), descrita pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2008, com algumas modificações. A emulsão da di-hidrojasmona foi preparada utilizando DMSO e Tween 80, sendo sua concentração de teste variando entre 1024  $\mu\text{g/mL}$  e 0,5  $\mu\text{g/mL}$ . A anfotericina B (controle positivo) foi utilizada nos ensaios em concentrações que variam de 16 a 0,0156  $\mu\text{g/mL}$ .

Controles de viabilidade microbiana, esterilidade do meio e dos solventes utilizados para preparação do composto também foram realizados. Todos os ensaios foram realizados em triplicata. As placas foram então incubadas à 35 °C durante 24h. Após esse tempo, a leitura foi realizada visualmente. A CIM foi definida como a menor concentração do composto capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico de pelo menos 50% das cepas ensaiadas. O resultado foi expresso pela média aritmética das CIM's obtidas nos três ensaios.

A atividade antifúngica dos produtos naturais foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios:  $\leq 500 \mu\text{g/mL}$  = atividade forte/ótima; 600 - 1500  $\mu\text{g/mL}$  = atividade moderada; acima de 1500  $\mu\text{g/mL}$  = atividade fraca ou produto inativo (Sartoratto et al., 2004).

Após leitura da CIM, alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  do sobrenadante das cavidades onde foi observada completa inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x 4) nas placas de microdiluição, foram adicionadas em meio ágar Sabouraud

dextrose e incubadas à  $35 \pm 2$  °C durante 24 horas. A CFM foi considerada como a menor concentração do composto em que não acontecerá crescimento de UFCs no meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado expresso pela média aritmética das CFM's obtidas nos três ensaios (Balouiri et al., 2016; Ncube N. S. et al., 2008)

#### Ação sobre parede celular fúngica (ensaio com sorbitol)

Este ensaio compara as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos.

Para a determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol, utilizou-se do meio RPMI 1640 sem sorbitol ou previamente adicionado de sorbitol (PM = 182,17g/mol) (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Por último, foi realizado o mesmo procedimento com o antifúngico convencional com conhecida ação sobre a parede celular, a caspofungina. As placas foram seladas e incubadas durante 48 horas à 35-37°C para posterior leitura (Escalante et al., 2008; Frost et al., 1995)

#### Ação sobre o ergosterol presente na membrana celular fúngica

Outro alvo de ação do produto testado pode ser o ergosterol da membrana celular. Para isso foi utilizada a metodologia de microdiluição, descrita anteriormente, na presença e na ausência do ergosterol exógeno. Neste caso, o meio RPMI 1640 é acrescido do ergosterol exógeno numa concentração de 400 µg/mL, e ao realizar a leitura, os valores da CIM são comparados na sua presença e na ausência do mesmo. Assim, o ensaio revela a qual propriedade o produto tem afinidade pelo ergosterol que compõe a membrana celular fúngica ou não. Para o controle positivo, foi realizado o mesmo ensaio com a anfotericina B, uma vez que essa possui o ergosterol da membrana celular como alvo farmacológico (Escalante et al., 2008)

### 3. Resultados e Discussão

Infecções fúngicas invasivas ou persistentes tem sido particularmente um problema no ambiente hospitalar, particularmente em pacientes imunocomprometidos. Principalmente devido pequeno arsenal terapêutico antifúngico, além do alto custo total do tratamento, efeitos adversos dos fármacos e aparecimento de cepas resistentes. Isso impulsiona a busca de alternativas a este cenário (Heard et al., 2021)

Os valores da CIM e CFM de di-hidrojasmona estão demonstrados na Tabela 1. O terpeno apresentou uma CIM de 128 - 256 µg/mL, dependendo da cepa ensaiada, demonstrando, segundo critérios de (Sartoratto et al., 2004) forte atividade antifúngica. Sua CFM foi igual a CIM, demonstrando natureza fungicida, uma vez que a razão CFM/CIM < 4 (Siddiqui et al., 2013).

**Tabela 1:** CIM e CFM da Di-hidrojasmona frente cepas de *Candida albicans* e *C. parapsilosis*.

Microrganismos	Di-hidrojasmona		$\frac{CFM}{CIM}$	Natureza de Atividade	*Anf B	Controles		
	CIM	CFM			CIM	**MO	***Est	
<i>Candida albicans</i>	ATCC 76485	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM-587	128	128	2	Fungicida	0,25	+	-
	LM-616	256	256	2	Fungicida	0,25	+	-
<i>Candida parapsilosis</i>	ATCC 22019	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM-439	256	512	1	Fungicida	0,50	+	-
	LM-55117	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM-5770	256	256	2	Fungicida	0,50	+	-

Legenda: \*anfotericina B; \*\*microrganismo; \*\*\*esterilidade; (+) crescimento positivo; (-) ausência de crescimento.

Fonte: Autores.

No estudo realizado por Pinto, (2019) o di-hidrojasmona apresentou CIM entre 256 e 512 µg/mL frente cepas de dermatófitos testadas, corroborando com os nossos achados e afirmando seu potencial antifúngico.

Assim como a di-hidrojasmona, o timol é um monoterpeno, que se diferencia do DHJ por possuir uma hidroxila em sua estrutura, peso molecular menor (150,22 g/mol) e atividade antimicrobiana já relatada. No estudo de Sousa et al., (2020), sua atividade foi avaliada frente cepas de *C. parapsilosis*, incluindo a ATCC 22019 também testada no presente estudo. O timol apresentou atividade fungicida diante todas as cepas testadas, com razão CFM/CIM menor que 4.

Uma vez estabelecido a forte atividade antifúngica da di-hidrojasmona, este estudo buscou determinar por qual mecanismo o monoterpeno agiria. Para este fim, utilizou-se o ensaio com sorbitol e com ergosterol exógeno, e os resultados estão plotados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Valores de CIM (µg/mL) da Di-hidrojasmona (DHJ), na ausência e na presença de sorbitol (0.8 M) e ergosterol (400 µg/mL) frente *Candida* spp.

Microrganismos	CIM (µg/mL)					
	<i>C. albicans</i> ATCC 76485	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 76485	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	<i>C. albicans</i> ATCC 76485	<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019
Fármacos	- Esteroides		+ Sorbitol		+ Ergosterol	
DHJ	256	128	256	128	512	512
Anfotericina B	0,25	0,25			4	4
Caspofungina	0,031	0,031	1	1		

Legenda: DHJ: di-hidrojasmona. Fonte: Autores.

Observa-se que a CIM da di-hidrojasmona frente as cepas ensaiadas, aumentou na presença do ergosterol exógeno e permaneceu a mesma na presença do sorbitol, sugerindo que o mecanismo de ação de DHJ ocorre a partir de sua ligação ao ergosterol presente na membrana. Este é o primeiro estudo que demonstra tal mecanismo.

No ensaio realizado com o monoterpeno timol de acordo com Sousa et al., (2020) , não foi observada alteração nos valores da CIM na presença do sorbitol nem do ergosterol frente *C. parapsilosis*, constatando que o monoterpeno utiliza um outro mecanismo para atuar sobre a levedura, excluindo a parede celular fúngica e a membrana fúngica.

O estudo de Oliveira e Santos, (2021) demonstrou que a ação antifúngica atribuída ao óleo essencial de *Cymbopogon citratus* se dá pela presença de seu composto majoritário, o terpeno citral. Silva et al., (2017) avaliou a atividade do óleo frente *C. albicans* e *C.tropicalis*, determinando sua CIM, CFM e ação na presença do sorbitol. Foi observada forte atividade antifúngica, com CIM entre 125 µg/mL e 250 µg/mL, bem como atividade fungicida, e que a presença do protetor osmótico não interferiu na ação.

#### 4. Conclusão

Baseado nestes resultados, o presente estudo demonstra que o monoterpeno di-hidrojasmona possui forte atividade antifúngica frente espécies de *Candida* fluconazol resistentes e sugere que esta atividade esteja relacionada a sua ação no ergosterol de membrana. Logo, di-hidrojasmona demonstrou ser um promissor produto na busca de alternativas para o tratamento das candidíases. O que impulsiona para testes mais específicos de estudos pré-clínicos e clínicos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal da Paraíba (UFPB) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio estrutural e financeiro para a realização deste trabalho.

## Referências

- Antinori, S., Milazzo, L., Sollima, S., Galli, M., & Corbellino, M. (2016). Candidemia and invasive candidiasis in adults: A narrative review. In *European Journal of Internal Medicine* 34, 21–28. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.ejim.2016.06.029>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. In *Journal of Pharmaceutical Analysis* (Vol. 6, Issue 2, pp. 71–79). Xi'an Jiaotong University. <https://doi.org/10.1016/j.jpaha.2015.11.005>
- Chang, Y. L., Yu, S. J., Heitman, J., Wellington, M., & Chen, Y. L. (2017). New facets of antifungal therapy. In *Virulence*. 8(2), 222–236. Taylor and Francis Inc. <https://doi.org/10.1080/21505594.2016.1257457>
- CLSI. (2008). *M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition*. [www.clsi.org](http://www.clsi.org).
- Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., & Zacchino, S. (2008). Evidence for the Mechanism of Action of the Antifungal Phytolaccoside B Isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products*, 71(10). <https://doi.org/10.1021/np070660i>
- Farias, L. A. B. G., Santos, A. P. de S., & Damasceno, L. S. (2021). Candidemia associada à infecção por SARS-COV-2: um relato de dois casos. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 25, 101385. <https://doi.org/10.1016/J.BJID.2020.101385>
- Frost, D. J., Brandt, K. D., Cugier, D., & Goldman, R. (1995). A Whole-Cell *Candida albicans* Assay for the Detection of Inhibitors towards Fungal Cell Wall Synthesis and Assembly. *The Journal of Antibiotics*, 306–310. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.306>
- Heard, S. C., Wu, G., & Winter, J. M. (2021). Antifungal natural products. *Current Opinion in Biotechnology*, 69, 232–241. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2021.02.001>
- Lass-Flörl, C., Samardzic, E., & Knoll, M. (2021). Serology anno 2021—fungal infections: from invasive to chronic. *Clinical Microbiology and Infection*, 27(9), 1230–1241. <https://doi.org/10.1016/J.CMI.2021.02.005>
- Musiol, R., & Kowalczyk, W. (2012). Azole Antimycotics - A Highway to New Drugs or a Dead End? *Current Medicinal Chemistry*, 19(9). <https://doi.org/10.2174/092986712799462621>
- Ncube N. S., Afolayan A. J., & Okoh A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*, 7(12), 1797–1806. <http://www.academicjournals.org/AJB>
- Oliveira, C. C. A. de, & Santos, J. S. (2021). Compostos ativos de capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*): uma revisão. *Research, Society and Development*, 10(12), e263101220281. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20281>
- Pinto, Â. V. (2019). *Potencial modulador de monoterpenos sobre a sensibilidade de dermatófitos a terbinafina*.
- Sartoratto, A., Lúcia, A., Machado, M., Delarmelina, C., Glyn, ;, Figueira, M., Marta, ;, Duarte, C. T., Vera, & Rehder, L. G. (2004). Composition And Antimicrobial Activity Of Essential Oils From Aromatic Plants Used In Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275–280.
- Scorzoni, L., Sangalli-Leite, F., de Lacorte Singulani, J., de Paula e Silva, A. C. A., Costa-Orlandi, C. B., Fusco-Almeida, A. M., & Mendes-Giannini, M. J. S. (2016). Searching new antifungals: The use of in vitro and in vivo methods for evaluation of natural compounds. *Journal of Microbiological Methods*, 123, 68–78. <https://doi.org/10.1016/J.MIMET.2016.02.005>
- Siddiqui, Z. N., Farooq, F., Muthafa, T. N. M., Ahmad, A., & Khan, A. U. (2013). Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(2), 237–243. <https://doi.org/10.1016/J.JSCS.2011.03.016>
- Silva Filho, C. A. M., Cavalcanti, A. C. F., Amorim, C. M., Neves, R. P., & Neves, H. J. P. (2017). *Produção de terpenoides com atividade antifúngica frente à candida sp capítulo produção de terpenoides com atividade antifúngica frente à candida SP*. <http://repositorio.ascs.edu.br/handle/123456789/1246>
- Silva, N. L., Araújo, Í. P. C., Batista, M. R. F., Santos, T. B. A., Fernando, W. L., & Amaral, F. R. (2017). Determinação da atividade antioxidante e teor de flavonoides totais equivalentes em quercetina em folhas de *Cymbopogon citratus* (d.c.) stapf e *Melissa officinalis* lam. *Conexão Ciência (Online)*, 12(1), 46–53. <https://doi.org/10.24862/cco.v12i1.499>
- Sousa, J. P. de, Medeiros, C. I. S., Pereira, F. de O., Guerra, F. Q. S., Oliveira Filho, A. A. de, & Lima, E. de O. (2020). Estudo do potencial antifúngico e do mecanismo de ação do timol contra cepas de *Candida parapsilosis* resistentes ao fluconazol e a anfotericina B. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas*, 19(3), 489. <https://doi.org/10.9771/cmbio.v19i3.32901>
- Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayo, G., Cáceres, A., Cechinel Filho, V., Giménez, A., Pinzón, R., Zacchino, S. A., & Gupta, M. (2010). Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. *Journal of Ethnopharmacology*, 127(1), 137–158. <https://doi.org/10.1016/J.JEP.2009.09.034>
- Vieira, A. J. H., & Santos, J. I. dos. (2017). Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *Revista Brasileira de Análises Clínicas*, 49(3). <https://doi.org/10.21877/2448-3877.201600407>