

Efeito antifúngico de α -pineno isolado e em associação com antifúngicos frente às cepas de *Candida albicans*

Antifungal effect of α -pinene alone and in association with antifungals against *Candida albicans* strains

Efecto antifúngico del α -pineno solo y en asociación con antifúngicos contra cepas de *Candida albicans*

Recebido: 07/03/2022 | Revisado: 13/03/2022 | Aceito: 20/03/2022 | Publicado: 27/03/2022

Daniela Bomfim de Barros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0707-0090>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: daniela.bomfim@ufpe.br

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

Larissa Alves Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5073-7033>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: 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

Hermes Diniz-Neto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2878-1737>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: hermes.dn@ltf.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

Gheorgia Victoria de Medeiros Beltrão

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1331-742X>
Centro Universitário Maurício de Nassau, Brasil
E-mail: gheorgiamedeiros@hotmail.com

Lúcio Roberto Caçado Castellano

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0851-5298>
Universidade Federal da Paraíba, Brasil
E-mail: lucio.castellano@ccs.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

Márcia Vanusa da Silva

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2221-5029>
Universidade Federal de Pernambuco, Brasil
E-mail: marcia.vanusa@ufpe.br

Resumo

Causada por fungos do gênero *Candida* spp., a candidíase é relatada como problema de saúde pública, ocasionando infecções superficiais e sistêmicas. O aumento de cepas resistentes isoladas e a elevada toxicidade dos antifúngicos convencionais, têm estimulado a busca por alternativas a este cenário, tais como bioprodutos ou compostos isolados, como exemplo, os terpenos. Desta maneira, faz-se importante investigar a atividade antifúngica de α -pineno isolado e em associação com antifúngicos frente a cepas de *Candida albicans*. Para isso foram determinadas a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM), pela técnica de microdiluição em caldo do terpeno isolado e o ensaio de associação (*checkerboard*) entre o α -pineno e antifúngicos, como fluconazol e anfotericina B. O α -pineno apresentou uma CIM entre 128 e 512 $\mu\text{g/mL}$ e a CFM teve os mesmos valores de CIM frente às cepas 8 cepas

ensaiadas. As demais concentrações não foram possíveis determinar a CFM, devido ao crescimento fúngico ser maior ou igual a CIMx4 (limite do teste). No ensaio de associação, a interação α - pineno e fluconazol foi indiferente, já as combinações entre α -pineno com a anfotericina B e a nistatina obtiveram efeitos sinérgicos. Assim, este estudo fortalece o α -pineno como um promissor agente antifúngico, pois este exibiu forte atividade inibitória frente a cepas de *Candida albicans*., com natureza fungicida. Adicionalmente, há a possibilidade deste ser utilizado de forma associativa aos derivados poliênicos (anfotericina B ou nistatina) como alternativa no tratamento da candidíase. Deve-se destacar que mais estudos precisam ser realizados acerca do mecanismo de ação e toxicidade deste composto.

Palavras-chave: Candida; Terpeno; Terapêutica; Produto natural; Associação.

Abstract

Caused by fungi of the genus *Candida* spp., candidiasis is reported as a public health problem, causing superficial and systemic infections. The increase in isolated resistant strains and the high toxicity of conventional antifungal agents have stimulated the search for alternatives to this scenario, such as bioproducts or isolated compounds, such as terpenes. Thus, it is important to investigate the antifungal activity of α -pinene alone and in association with antifungals against strains of *Candida albicans*. For this, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Fungicide Concentration (MFC) were determined by the technique of microdilution in broth of the isolated terpene and the association assay (checkerboard) between α -pinene and antifungals, such as fluconazole and amphotericin. B. The α -pinene had a MIC between 128 and 512 $\mu\text{g/mL}$ and the CFM had the same MIC values against the 8 strains tested. The other concentrations could not determine the CFM, due to the fungal growth being greater than or equal to MICx4 (test limit). In the association trial, the interaction between α -pinene and fluconazole was indifferent, whereas the combinations between α -pinene with amphotericin B and nystatin obtained synergistic effects. Thus, this study strengthens α -pinene as a promising antifungal agent, as it exhibited strong inhibitory activity against *Candida albicans* strains, with a fungicidal nature. Additionally, it may be used in association with polyene derivatives (amphotericin B or nystatin) as an alternative in the treatment of candidiasis. It should be noted that more studies need to be carried out on the mechanism of action and toxicity of this compound.

Keywords: Candida; Terpene; Therapy; Natural product; Association.

Resumen

Causada por hongos del género *Candida* spp., la candidiasis es reportada como un problema de salud pública, provocando infecciones superficiales y sistémicas. El aumento de cepas resistentes aisladas y la alta toxicidad de los antifúngicos convencionales han estimulado la búsqueda de alternativas a este escenario, como bioproductos o compuestos aislados, como los terpenos. Por lo tanto, es importante investigar la actividad antifúngica del α -pineno solo y en asociación con antifúngicos contra cepas de *Candida albicans*. Para ello se determinó la Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) y la Concentración Mínima de Fungicida (MFC) mediante la técnica de microdilución en caldo del terpeno aislado y el ensayo de asociación (tablero) entre α -pineno y antifúngicos, como fluconazol y anfotericina. B. El α -pineno tuvo una MIC entre 128 y 512 $\mu\text{g/mL}$ y el CFM tuvo los mismos valores de MIC frente a las 8 cepas probadas. Las otras concentraciones no pudieron determinar el CFM, debido a que el crecimiento fúngico fue mayor o igual a MICx4 (límite de prueba). En el ensayo de asociación, la interacción entre α -pineno y fluconazol fue indiferente, mientras que las combinaciones entre α -pineno con anfotericina B y nistatina obtuvieron efectos sinérgicos. Por lo tanto, este estudio fortalece al α -pineno como un agente antifúngico prometedor, ya que exhibió una fuerte actividad inhibidora contra las cepas de *Candida albicans*, con una naturaleza fungicida. Además, puede utilizarse en asociación con derivados poliênicos (anfotericina B o nistatina) como alternativa en el tratamiento de la candidiasis. Cabe señalar que es necesario realizar más estudios sobre el mecanismo de acción y la toxicidad de este compuesto.

Palabras clave: Cándida; Terpeno; Terapia; Producto natura; Asociación.

1. Introdução

Doenças causadas por fungos têm aumentado significativamente os indicadores de saúde de morbimortalidade em todo o mundo (Jenks et al., 2020). Estima-se que estas infecções afetem mais de um bilhão de indivíduos e que levem a óbito cerca de 1,5 milhão de pessoas por ano. Embora esses dados sejam alarmantes, as mesmas permanecem negligenciadas por autoridades sanitárias (Bongomin et al., 2017).

Infecções fúngicas são, em sua maioria, oportunistas, sendo capazes de ocasionar doenças em pacientes imunossuprimidos, como aqueles com neoplasias, transplantados ou mesmo os que se encontram em Unidades de Terapia Intensiva (UTIs) (Bongomin et al., 2017; Lass-Flörl et al., 2021). Dentre os principais agentes causadores de Infecções Fúngicas

Invasivas (IFI) encontram-se os fungos dos gêneros *Aspergillus spp.*, *Cryptococcus spp.* e *Candida*, com destaque para este último, cuja espécie *Candida albicans* está mais comumente associada aos casos de IFI (Song, 2020).

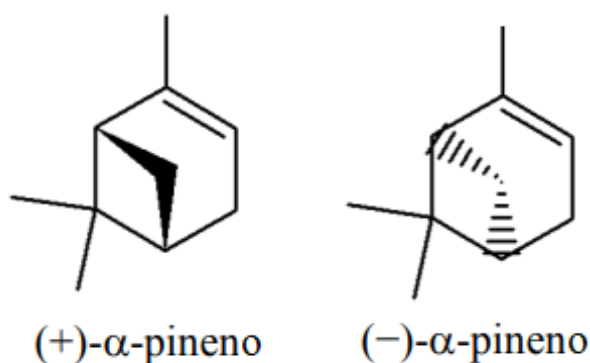
Leveduras da espécie *C. albicans* podem ser tanto comensais quanto patogênicas, levando a manifestações clínicas em indivíduos com imunossupressão, que variam desde a forma mucocutânea (candidíase orofaríngea, vaginal e cutânea) até a forma disseminada, mais grave, relacionada às infecções nosocomiais com elevadas taxas de mortalidade (Jawale & Biswas, 2021).

Os antifúngicos convencionais mais utilizados no tratamento das infecções causadas por *Candida spp.* são os derivados azólicos (tais como: fluconazol, itraconazol, miconazol, clotrimazol e cetoconazol), os derivados polienos (tais como: anfotericina B e nistatina) e as equinocandinas (tais como caspofungina, micafungina e anidulofungina) (Kathiravan et al., 2012; Patil, 2015; Santos et al., 2018).

Entretanto, tratamentos prolongados com estes fármacos podem levar à efeitos citotóxicos, bem como resistência ao antifúngico, constituindo-se como um grave problema a ser solucionado (Kathiravan et al., 2012; Vieira & Santos, 2017). Nesse contexto, a busca de alternativas a este cenário é necessária, umas das frentes de pesquisa é a bioprospecção para obtenção de produtos naturais, pois a biodiversidade é uma fonte de uma grande variedade de compostos bioativos, (Doi et al., 2016; Oliveira et al., 2014), a exemplo dos terpenos, maiores e mais diversos metabólitos secundários de plantas, os quais desempenham importante papel na sua defesa, como fitoalexinas (Ninkuu et al., 2021).

Nas plantas, os pinenos apresentam atividade fungicida e têm sido usados há séculos para produzir sabores e fragrâncias. Diversas atividades biológicas estão associadas aos mesmos, incluindo o uso como inseticida natural (Silva et al., 2012). O α -pineno (Figura 1) é um terpeno constituinte majoritário de diversos óleos essenciais (Bakkali et al., 2008), a exemplo dos óleos provenientes das plantas do gênero *Croton spp.* (Fortes & Guedes, 2006; Celedonio, 2008), possuindo atividade antifúngica contra às espécies de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea*, *C. guilhermondii*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans* (Lima et al., 2005).

Figura 1: Fórmula estrutural plana do α -pineno.



Fonte: Adaptado de Silva et al. (2012).

Dessa forma, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de α -pineno isolado e em associação com antifúngicos convencionais frente às cepas de *Candida spp.*

2. Metodologia

2.1 Cepas fúngicas

Cepas de *Candida albicans* ensaiadas foram obtidas da Micoteca do Laboratório de Micologia Clínica da Universidade Federal da Paraíba. Foram utilizadas 2 cepas padrão ATCC-76485, ATCC-90028 e 6 cepas clínicas (LM-587, LM 616, A-05, A-11, A-15 e A-20).

2.2 Reagentes de uso

Os meios de cultura utilizados nos ensaios foram ágar Sabouraud dextrose (ASD) e RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio, bem como o terpeno α -pineno, os antifúngicos, dimetilsulfóxido (DMSO) e Tween 80, foram obtidos comercialmente, oriundos do fabricante Sigma Aldrich®.

2.3 Preparação do Inóculo

Para preparação do inóculo, culturas de *Candida* spp., foram semeadas em meio nutriente e incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 e 48 h. Foram utilizados entre 4 e 5 colônias dessas culturas e, em seguida, suspensas em H₂O destilada estéril, ajustadas de acordo com o padrão 0,5 da escala de McFarland, para obter um inóculo de 10^6 UFC/mL. Por fim, os inóculos foram separados para utilização nos ensaios (Hadacek & Greger, 2000; Ostrosky et al., 2008; Cleeland & Squires, 1991).

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

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados conforme os protocolos de Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) (2011), com adaptações. A determinação da CIM do produto sobre cepas de *Candida albicans*, foram realizadas por meio da técnica de microdiluição em caldo com auxílio de microplaca contendo 96 poços com fundo em forma de “U” (ALAMAR®).

Inicialmente, foram distribuídos 100 μ L de Caldo RPMI nos poços das placas. Em seguida, 100 μ L do produto foi dispensado nas cavidades de cada coluna da placa. Logo depois, foi feita uma diluição seriada a uma razão de um para dois (1:2), de forma que as concentrações finais nos poços após a adição do inóculo foram de 1024 μ g/mL até 0,5 μ g/mL. Por fim, foi adicionado 10 μ L do inóculo das leveduras nas cavidades, onde cada linha da placa refere-se a uma cepa fúngica específica. Concomitantemente, foram realizados controle com anfotericina B (1024 μ g/mL até 0,5 μ g/mL), caldo RPMI como controle de esterilidade e caldo RPMI com inóculo fúngico como controle de viabilidade das leveduras. Todo o ensaio foi realizado em triplicata e as placas, hermeticamente fechadas e foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 h, posteriormente realizada a leitura.

A CIM da substância foi vista como a menor concentração capaz de produzir inibição visível sobre o crescimento fúngico da maior porcentagem de cepas verificada nos poços, em comparação com seu controle. A expressão do resultado é feita pela média aritmética das CIM's dos três ensaios, sendo a atividade antifúngica do produto ativa ou inativa, seguindo os seguintes critérios: < abaixo de 500 μ g/mL= forte/ótima atividade; 600- 1500 μ g/mL= moderada atividade; > acima de 1500 μ g/mL= fraca atividade ou produto inativo (Balouiri et al., 2016; Sartoratto et al., 2004).

Feita a leitura da CIM, retirou-se 10 μ L do sobrenadante dos poços onde foi observada total inibição do crescimento fúngico (CIM, CIM x2 e CIM x4) e adicionou-se em novas placas de cultura de células com meio ASD, posteriormente incubadas em temperatura de 35-37 °C por 24h. A CFM foi a menor concentração do α -pineno em que não aconteceu crescimento fúngico no meio. O resultado foi obtido pela média aritmética das CFM's obtidas nos ensaios feitos em triplicata (Balouiri et al., 2016; Ncube et al., 2008).

2.5 Ensaio de associação do terpeno com antifúngicos padrões frente às cepas de *Candida albicans*

Soluções do composto teste e dos antifúngicos foram solubilizadas e preparadas diluições em concentrações dobradas (2048 e 1024 μ g/mL, respectivamente) em relação à concentração inicial definida e volumes de 100 μ L foram diluídos seriadamente 1:2 em RPMI 1640. Em cada cavidade com 100 μ L do meio de cultura foi inserido 10 % da suspensão fúngica. Cada microplaca estéril foi preenchida no sentido vertical e horizontal, com o composto teste e um antifúngico por vez para a

obtenção do índice de Concentração Inibitória Fracionada (índice CIF). As placas preenchidas foram incubadas a temperatura e tempo adequados para cada espécie.

O índice CIF foi calculado através da soma do $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o antifúngico e B o composto teste em teste. O CIF^A , por sua vez, será calculado pela relação CIM^A combinado/ CIM^A sozinho, enquanto que o $CIF^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B sozinho. Este índice foi interpretado da seguinte forma: sinergismo (< 0.5), aditividade ($0.5 - 1.0$), indiferença (> 1.0) ou antagonismo (> 4.0) (Eliopoulos & Moellering, 1991).

3. Resultados e Discussão

O α -pineno foi testado frente à 8 linhagens de *Candida albicans* (2 cepas padrões ATCC: 76485 e 90028; e 2 cepas sistêmicas LM 587 e LM 616; e 4 cepas de amostras bucais: A 011, A 05, A 15 e A 20) e teve sua Concentração Inibitória Mínima (CIM) melhor estabelecida. A concentração fungicida mínima (CFM) também foi avaliada, conforme observado na Tabela 1.

A molécula apresentou atividade inibitória contra todas as linhagens testadas, com uma CIM variando de 128 e 512 $\mu\text{g/mL}$. Frente as linhagens de *C. albicans* ATCC 76485 e LM 587 exibiu uma CIM de 128 $\mu\text{g/mL}$ ($\approx 25\%$) das 8 (100%) cepas, 256 $\mu\text{g/mL}$ para as cepas ATCC 90028, LM 616, A 05, A 11 e A 15 ($\approx 62,5\%$) e 512 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa A 20 ($\approx 12,5\%$).

Para Sartoratto *et al.* (2004), a CIM da molécula pode ser considerada com forte/ótima atividade inibitória, visto que foi inferior a 500 $\mu\text{g/mL}$. Entretanto, ao considerar parâmetros estabelecidos por outros autores, a molécula pode ser considerada de atividade moderada (CIM entre 100 e 500 $\mu\text{g/mL}$) (Holetz *et al.*, 2002; Machado *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2008).

A maioria dos estudos sobre o enantiômero α -pineno é com foco em células bacterianas, no entanto ainda são escassos os trabalhos sob a ótica da atividade antifúngica, havendo então uma deficiência de dados na literatura sobre α -pineno que se possa comparar com os resultados do presente estudo.

Silva *et al.* (2012) detectou a atividade antimicrobiana de isômeros e enantiômeros de pineno frente às células bacterianas e fúngicas. A Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Microbicida Mínima (CMM) desses monoterpenos também foram determinadas, confirmando que os enantiômeros positivos exibiram atividade contra todos os fungos e bactérias testados, com MICs variando entre 117 e 4,150 $\mu\text{g/mL}$.

O terpeno apresentou uma CFM variando entre 128 e 512 $\mu\text{g/mL}$ para as leveduras testadas. Contra as cepas de *C. albicans*, a substância exibiu uma CFM de 128 $\mu\text{g/mL}$ para ATCC 76485 e LM 587 (25%) das 8 (100%) cepas, 256 $\mu\text{g/mL}$ para a ATCC 90028 e LM 616 (25%) cepas e 512 $\mu\text{g/mL}$ para a cepa A 20 (12,5%). No entanto, não foi possível determinar a CFM do produto para as cepas A 05, A 11 e A 15, visto que houve crescimento nas placas de todas as concentrações utilizadas no ensaio (CIM, CIMx2 e CIMx4), sugerindo que o α -pineno teve ação fungistática frente às cepas. Logo a natureza fungicida e fungistática foi dependente da cepa ensaiada.

Tabela 1 - Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do α pineno frente às linhagens de *Candida albicans*.

Cepas	Alfa pineno			Natureza de Atividade	Anfotericina B	Controles		
	CIM	CFM	$\frac{CFM}{CIM}$		CIM	**MO	***Est	
<i>Candida albicans</i>	ATCC-76485	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
	ATCC- 90028	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM 587	128	128	1	Fungicida	0,25	+	-
	LM 616	256	256	1	Fungicida	0,25	+	-
	A 05	256	≥1024	ND	Fungistática	0,25	+	-
	A 11	256	≥1024	ND	Fungistática	0,25	+	-
	A 15	256	≥1024	ND	Fungistática	0,25	+	-
	A 20	512	512	1	Fungicida	0,50	+	-

Legenda: **MO, microrganismo; ***Est, esterilidade; (+), presença de crescimento microbiano em todas as concentrações testadas; (-), ausência de crescimento em todas as concentrações testadas; ND, razão CFM:CIM não determinado. Fonte: Autores (2022).

Uma vez observado esta atividade antifúngica, verificou-se se o terpeno teste poderia ser utilizado em associação com antifúngicos convencionais. Os resultados do ensaio de associação do alfa pineno com anfotericina B, nistatina e fluconazol estão descritos na Tabela 4. Na associação entre o alfa pineno e os antifúngicos anfotericina B e nistatina frente à cepa ATCC 76485 foram observados efeitos de aditividade (ICIF: 0,5 - 1). Já a combinação entre o alfa pineno e fluconazol resultou em um tipo de interação indiferente (ICIF: >1) frente à cepa ATCC 76485.

Tabela 2 - Determinação do Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) da associação entre alfa pineno com anfotericina B, nistatina e fluconazol sobre a cepa ATCC 76485 de *Candida albicans*.

Cepas	Alfa pineno + Anfotericina B		Alfa pineno + Nistatina		Alfa pineno + Fluconazol	
	ICIF	Tipo de Interação	ICIF	Tipo de Interação	ICIF	Tipo de Interação
	<i>C. albicans</i> (ATCC-76485)	1	Aditividade	1	Aditividade	2

Fonte: Autores (2022).

De acordo com esses resultados, a interação entre alfa pineno e fluconazol se mostrou indiferente, já as combinações de α - pineno e anfotericina B e nistatina obtiveram efeitos aditivos, sugerindo possível associação entre estes fármacos como alternativa terapêutica

4. Conclusão

Este trabalho demonstra um promissor agente antifúngico, α -pineno, pois este exibiu forte atividade inibitória frente às cepas de *Candida albicans*., com natureza fungicida. Adicionalmente há a possibilidade deste ser utilizado de forma associativa aos derivados poliênicos (anfotericina B ou nistatina) como alternativa no tratamento da candidíase. Deve-se destacar que mais estudos precisam ser realizados acerca do mecanismo de ação e toxicidade deste composto.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse que poderia se constituir em um impedimento para a publicação deste artigo.

Agradecimentos

Os autores agradecem às Universidades Federal e de Pernambuco (UFPE) e Universidade Federal da Paraíba (UFPB), bem como à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio estrutural e financeiro para a execução do presente estudo.

Referências

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils - A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46(2), 446–475. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106>
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibensouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2015.11.005>
- Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R. O., & Denning, D. W. (2017). Global and multi-national prevalence of fungal diseases—estimate precision. *Journal of Fungi*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/jof3040057>
- Celedonio, N. R. (2008). Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e antiendematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* e seus constituintes: alfa-pineno e trans-cariofileno. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas).
- Cleeland, R. & Squires, E. (1991). Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine*, 3, 739–787.
- CLSI. (2011). *M27-A3 Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard-Third Edition*. www.clsi.org.
- Doi, A. M., Carlos, A., Pignatari, C., Edmond, M. B., Marra, R., Fernando, L., Camargo, A., & Siqueira, R. A. (2016). *Epidemiology and Microbiologic Characterization of Nosocomial Candidemia from a Brazilian National Surveillance Program*. 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146909>
- Dos Santos, A. O., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga, V. F., Pinto, A. C., & Nakamura, C. V. (2008). Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 103(3), 277–281. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762008005000015>
- 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), 1720–1725. <https://doi.org/10.1021/np070660i>
- Eliopoulos, G. M. & Moellering, R. C. (1991). Antimicrobial combinations. *Antibiotics in laboratory medicine*, 434–441.
- Fortes, J. C. & Guedes, M. I. F. (2006). Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* muell arg e de frações isoladas dos extratos de *Astronium urundeuva* (Alémão) Engl. Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, 58.
- 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*, 48(4), 306–310. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.306>
- Hadacek, F., & Greger, H. (2000). Testing of antifungal natural products: Methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*, 11(3), 137–147. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(200005/06\)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I](https://doi.org/10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I)
- Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, A. G., Nakamura, C. V., Prado, B., & Filho, D. (2002). Screening Pl Medicinaias 2.Pdf. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 97(7), 1027–1031.
- Jawale, C. V. & Biswas, P. S. (2021). ScienceDirect Local antifungal immunity in the kidney in disseminated candidiasis. *Current Opinion in Microbiology*, 62, 1–7. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2021.04.005>
- Jenks, J. D., Gagneux, J. P., Schwartz, I. S., Alastruey-Izquierdo, A., Lagrou, K., Thompson, G. R., Lass-Flörl, C., Hoenigl, M., Adamski, Z., Arkan Akdagli, S., Arsic-Arsenijevic, V., Cornely, O. A., Friberg, N., Gow, N., Hadina, S., Hamal, P., Juerna-Ellam, M., Klimko, N., Klingspor, L., & Verweij, P. (2020). Diagnosis of breakthrough fungal infections in the clinical mycology laboratory: An ecmm consensus statement. *Journal of Fungi*, 6(4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/jof6040216>
- Kathiravan, M. K., Salake, A. B., Chothe, A. S., Dudhe, P. B., Watode, R. P., Mukta, M. S., & Gadhwhe, S. (2012). Bioorganic & Medicinal Chemistry The biology and chemistry of antifungal agents : A review. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 20(19), 5678–5698. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.045>
- 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>
- Lima, I. O., Oliveira, R. D. A. G., Lima, E. D. O., De Souza, E. L., Farias, N. P., & Navarro, D. D. F. (2005). Inhibitory effect of some phytochemicals in the growth of yeasts potentially causing opportunistic infections. *Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 41(2), 199–203. <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000200007>

- Machado, K. E., Cechinel Filho, V., Tessarolo, M. L., Mallmann, R., Meyre-Silva, C., & Bella Cruz, A. (2005). Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. *Pharmaceutical Biology*, 43(7), 636–639. <https://doi.org/10.1080/13880200500303817>
- 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. <https://doi.org/10.5897/AJB07.613>
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11). <https://doi.org/10.3390/ijms22115710>
- Oliveira, J. S.; Machado, K. C.; Freitas, R. M. (2014). Natural Products Applied a Neglected Diseases: Technological Forecasting. *Revista Geintec: Gestão, Inovação e Tecnologias*, 4, 729- 734.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E. L., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 301–307. <https://doi.org/10.1590/s0102-695x2008000200026>
- Patil, S. (2015). *Clinical Appearance of Oral Candida Infection and Therapeutic Strategies*. 6(December), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01391>
- Rajput, S. B., & Mohan Karuppaiyl, S. (2013). Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *SpringerPlus*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-26>
- Santos, G. C. D. O., Vasconcelos, C. C., Lopes, A. J. O., Rocha, F. M. G., & Monteiro, C. D. A. (2018). *Candida Infections and Therapeutic Strategies : Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents*. 9(July), 1–23. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01351>
- Sartoratto, A., Machado, A. L. M., Delarmelina, C., Figueira, G. M., Duarte, M. C. T., & Rehder, V. L. G. (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35(4), 275–280. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822004000300001>
- Silva, A. C. R. da, Lopes, P. M., Azevedo, M. M. B. de, Costa, D. C. M., Alviano, C. S., & Alviano, D. S. (2012). Biological Activities of α -Pinene and β -Pinene Enantiomers. *Molecules*, 17(6), 6305–6316. <https://doi.org/10.3390/molecules17066305>
- Song, B. (2020). *A 5-Year Review of Invasive Fungal Infection at an Academic Medical*. 10(October), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.553648>
- Tacconi, L. (2018). Scientific Methodology. In *Biodiversity and Ecological Economics*. <https://doi.org/10.4324/9781315096308-2>
- Valgus, J. M. (2003). What's new in antifungals? *Current Infectious Disease Reports*, 5(1), 16–21. <https://doi.org/10.1007/s11908-003-0060-4>
- Vieira, A. J. H. & Santos, J. I. (2017). Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. *RBAC*, 49(3), 235- 239.
- Zacchino, S. (2001). Estratégias para descoberta de novos agentes antifúngicos. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Ed. Argos.