



unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“Júlio de Mesquita Filho”

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos do eugenol e cinamaldeído em isolados clínicos de *Candida auris*

DÉBORA SILVA MARQUES DE SOUSA

ORIENTADOR: PROF. DRA. LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES

COORIENTADOR: PROF. ASSOC. ARY FERNANDES JÚNIOR

BOTUCATU-SP

2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

Efeitos do eugenol e cinamaldeído em isolados clínicos de *Candida auris*

DÉBORA SILVA MARQUES DE SOUSA

ORIENTADORA: PROF. DRA. LUCIANA DA SILVA RUIZ MENEZES

COORIENTADOR: PROF. ASSOC. ARY FERNANDES JÚNIOR

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração: Biologia de Parasitas e Microrganismos.

Prof. Dra. Luciana da Silva Ruiz Menezes

BOTUCATU-SP

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Sousa, Débora Silva Marques de.

Efeitos do eugenol e cinamaldeído em isolados clínicos de
Candida auris / Débora Silva Marques de Sousa. - Botucatu,
2024

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista
"Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de
Botucatu

Orientador: Luciana da Silva Ruiz Menezes

Coorientador: Ary Fernandes Júnior

Capes: 21201030

1. Antifúngicos. 2. *Candida auris*. 3. Eugenol.
4. Resistência a Múltiplos Medicamentos. 5. Produtos
Naturais.

Palavras-chave: Atividade antifúngica; *C. auris*;
Cinamaldeído; Eugenol; Multirresistência.

Dedicatória

Dedico esse trabalho aos meus pais e irmão, por todo o apoio durante esses anos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à Deus, por ter permitido que eu chegasse até aqui e me sustentado em meio às dificuldades. Por ter me dado forças quando eu acreditei que não conseguiria terminar esse trabalho.

Aos meus pais e irmão, Maria Sueli da Silva, José Marques de Sousa e Diego Silva Marques de Sousa, por todo o apoio emocional e financeiro por todos esses anos, desde a minha graduação.

Aos meus amigos de laboratório, Ana Flávia Marques Pereira, Tatiane Baptista Zapata, Alessandra Aguirra Sani, Nicolas Ripari, Gabrielle Pires de Moraes Monari e Cassiana Ferreira da Rosa. Obrigada por terem me ajudado a desenvolver esse trabalho e pela amizade nesses últimos anos. Vocês tornaram essa jornada mais leve.

Ao meu colaborador, Jacques Meis, por gentilmente ter cedido os isolados utilizados nesse trabalho.

À Mirian Carolin Esgoti Aal, por ter disponibilizado de seu tempo para me ensinar tudo sobre cultura celular. À equipe do Instituto de Biotecnologia de Botucatu (IBTEC) (Lucilene Delazari dos Santos, Bruna Cavecci Mendonça e aos demais alunos que colaboraram) pela disponibilidade de nos ajudar nesse trabalho com as análises proteômicas.

Aos professores Eduardo Bagagli e Sandra de Moraes Gimenes Bosco pelo apoio e por sempre me incentivarem a seguir em frente. Ao meu co-orientador, Ary Fernandes Júnior, por todo o apoio e incentivo no desenvolvimento desse trabalho.

À minha orientadora, Luciana da Silva Ruiz Menezes. Sempre serei grata por você ter aceitado me orientar em condições tão adversas. Obrigada por ter dividido comigo até o que você não tinha para que esse trabalho pudesse ser finalizado. Sem a sua ajuda, teria sido muito mais difícil finalizar essa dissertação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização deste projeto (processo número 2022/07036-0).

*“Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.”
(Leonardo da Vinci)*

“A maior recompensa pelo nosso trabalho não é o que nos pagam por ele, mas aquilo em que ele nos transforma.” (John Ruskin)

RESUMO

Candida auris foi identificada pela primeira vez no Japão há mais de uma década. Desde então, foi relatada em todos os continentes e tem se tornado uma ameaça global devido à sua rápida capacidade de desenvolver resistência à todas as classes de antifúngicos (azólicos, polienos e equinocandinas), comprometendo o tratamento das infecções. Também apresenta menor susceptibilidade aos desinfetantes hospitalares, facilitando sua permanência nesses locais. Em 2020 foi relatado o primeiro surto no Brasil, e desde então foram notificados mais de 70 casos em todo o país. Neste cenário, os produtos naturais têm sido amplamente estudados a fim de encontrar moléculas com potencial antimicrobiano. Poucos produtos com ação antifúngica foram aprovados nas últimas décadas por conta da citotoxicidade em células humanas. O eugenol e cinamaldeído apresentam ação antimicrobiana contra várias espécies de *Candida*. Assim, os objetivos deste estudo foi avaliar a ação destes compostos em isolados clínicos de *C. auris* através de testes de sensibilidade de microdiluição em caldo, bem como verificar os possíveis mecanismos de ação desses compostos através de análise proteômica. Ambos os produtos apresentaram uma ação fungicida em concentrações variando entre 31,25 e 250 µg/mL. Os produtos apresentaram ação sinérgica combinados entre si e em combinação com o itraconazol. Eugenol e cinamaldeído reduziram a produção de biomassa de biofilme em mais de 50%, entretanto, a biomassa de biofilme foi aumentada para a maioria dos isolados quando tratados com ambos os produtos. O eugenol não apresentou citotoxicidade nas concentrações em que inibe o crescimento da levedura. Por outro lado, o cinamaldeído se mostrou mais citotóxico nas concentrações em que houve inibição do crescimento, causando uma redução da viabilidade celular de até 95% na concentração de 500 µg/mL. A análise proteômica demonstrou que o mecanismo de ação de eugenol e cinamaldeído possivelmente está relacionada à biossíntese de ergosterol. Os resultados desse estudo sugerem que o eugenol pode ser um candidato para o desenvolvimento de formulações para o tratamento de infecções causadas por *C. auris*. Devido à elevada citotoxicidade e reatividade do cinamaldeído, esse composto poderia ser estudado como possíveis formulações de desinfetantes e seus derivados avaliados em relação à segurança.

Palavras-chave: Atividade antifúngica, *C. auris*, Cinamaldeído, Eugenol, Multirresistência, Produtos Naturais.

ABSTRACT

Candida auris was first identified in Japan more than a decade ago. Since then, it has been reported on all continents and has become a global threat due to its rapid ability to develop resistance to all classes of antifungals (azoles, polyenes and echinocandins), compromising the treatment of infections. It is also less susceptible to hospital disinfectants, making it easier to stay in these places. In 2020, the first outbreak was reported in Brazil, and since then more than 70 cases have been reported across the country. In this scenario, natural products have been widely studied in order to find molecules with antimicrobial potential. Few products with antifungal action have been approved in recent decades due to their cytotoxicity in human cells. Eugenol and cinnamaldehyde have antimicrobial action against several *Candida* species. So, the objectives of this study were to evaluate the action of these compounds on clinical isolates of *C. auris* through broth microdilution sensitivity tests, as well as to verify the possible mechanisms of action of these compounds through proteomic analysis. Both products showed a fungicidal action at concentrations ranging between 31.25 and 250 µg/mL. The products showed synergistic action combined with each other and in combination with itraconazole. Eugenol and cinnamaldehyde reduced biofilm biomass production by more than 50%, however, biofilm biomass was increased for most isolates when treated with both products. Eugenol did not show cytotoxicity at concentrations at which it inhibits yeast growth. On the other hand, cinnamaldehyde was more cytotoxic at concentrations where growth was inhibited, causing a reduction in cell viability of up to 95% at a concentration of 500 µg/mL. Proteomic analysis demonstrated that the mechanism of action of eugenol and cinnamaldehyde is possibly related to the biosynthesis of ergosterol. The results of this study suggest that eugenol may be a candidate for the development of formulations for the treatment of infections caused by *C. auris*. Due to the high cytotoxicity and reactivity of cinnamaldehyde, this compound could be studied as possible formulations of disinfectants and their derivatives evaluated for safety.

Keywords: Antifungal activity, *C. auris*, Cinnamaldehyde, Eugenol, Multidrug resistance, Natural Products.

Lista de Figuras

Figura 1. Interações sinérgicas entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol para os representantes dos clados I, II, III, IV, V, isolado da Bahia e CDC B11903.

Figura 2. Interações sinérgicas entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol para o representante do clado V, isolado da Bahia e CDC B11903.

Figura 3. Gráficos de inibição da formação de biomassa de biofilme por eugenol para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12.

Figura 4. Gráficos de inibição da formação de biomassa de biofilme por eugenol para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903.

Figura 5. Gráficos de inibição da formação de biomassa de biofilme por cinamaldeído para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12.

Figura 6. Gráficos de inibição da formação de biomassa de biofilme por cinamaldeído para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903.

Figura 7. Gráficos de atividade metabólica de biofilme por eugenol para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12.

Figura 8. Gráficos de atividade metabólica de biofilme por eugenol para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903.

Figura 9. Gráficos de atividade metabólica de biofilme por cinamaldeído para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12.

Figura 10. Gráficos de atividade metabólica de biofilme por cinamaldeído para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903.

Figura 11. Viabilidade celular após 48 horas de tratamento com eugenol.

Figura 12. Viabilidade celular após 48 horas de tratamento com cinamaldeído.

Figura 13. Elaboração da curva de calibração do método de Bradford, utilizando como proteína padrão comercial albumina bovina. Quatro diluições da proteína padrão foram ensaiadas para aquisição da equação da reta.

Figura 14. Diagrama de Venn evidenciando proteínas comuns entre os grupos Controle e Itraconazol.

Figura 15. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Itraconazol.

Figura 16. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Itraconazol.

Figura 17. Proteína expressa exclusivamente na amostra tratada com itraconazol, evidenciando a presença de transportadores do tipo ABC (bomba de efluxo).

Figura 18. Diagrama de Venn evidenciando 277 proteínas comuns entre os grupos Controle e Eugenol.

Figura 19. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Eugenol.

Figura 20. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Eugenol.

Figura 21. Diagrama de Venn evidenciando 218 proteínas comuns entre os grupos Controle e Cinamaldeído.

Figura 22. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Cinamaldeído.

Figura 23. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Cinamaldeído.

Figura 24. Diagrama de Venn evidenciando 46 proteínas comuns entre os grupos Controle e Cinamaldeído + Itraconazol.

Figura 25. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Cinamaldeído + Itraconazol.

Figura 26. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Cinamaldeído + Itraconazol.

Figura 27. Diagrama de Venn evidenciando 244 proteínas comuns entre os grupos Controle e Eugenol + Itraconazol.

Figura 28. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Eugenol + Itraconazol.

Figura 29. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Eugenol + Itraconazol.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Procedência e características filogenéticas das cepas de *C. auris* estudadas.

Tabela 2. Pontos de cortes provisórios (CDC-USA, 2020) para interpretação de testes de sensibilidade para isolados de *C. auris*.

Tabela 3. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL para eugenol, cinamaldeído, itraconazol, anfotericina B e caspofungina.

Tabela 4. Valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) em µg/mL para eugenol, cinamaldeído, itraconazol, anfotericina B e caspofungina.

Tabela 5. Quantificação de biofilme com cristal violeta a 590 nm.

Tabela 6. Verificação de atividade metabólica de biofilme com XTT a 486 nm.

Tabela 7. Obtenção dos dados de absorbância frente à diferentes diluições (massa) da proteína comercial albumina para obtenção da equação da reta junto ao método de Bradford.

Tabela 8. Concentração de proteínas nas amostras obtidas pelo método de Bradford.

Tabela 9. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com itraconazol.

Tabela 10. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com eugenol.

Tabela 11. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com cinamaldeído.

Tabela 12. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com cinamaldeído + itraconazol.

Tabela 13. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com eugenol + itraconazol.

Lista de Abreviaturas

ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BALB/c	Camundongos albinos
Ca ²⁺	Cálcio
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CDC	Centro de Controle e Prevenção de Doenças
CFM	Concentração Fungicida Mínima
Cl ⁻	Cloro
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CO ₂	Gás carbônico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido dexosirribonucleico
ELISA	<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>
EUCAST	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
Fe ₃ O ₄ SiO ₂	Magnetita
HaCat	Queratinócitos imortalizados de pele humana
HeLa	Células imortalizadas de câncer cervical
HeLa	Células de hepatocarcinoma
Hep-2	Células de câncer de laringe
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSG	células de glândula submandibular humanas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
K ⁺	Potássio
MALDI-TOF	<i>Matrix Associated Laser Desorption-Ionization</i>
Mg ²⁺	Magnésio
MOPS	ácido 3 (N-morfolino) propanosulfônico
MRC-5	Fibroblastos isolados de tecido pulmonar humano
NaOCl	Hipoclorito de sódio
PC12	Células de tumores secretores de hormônios
PBS	Tampão fosfato salino
TNF	Fator de necrose tumoral
UFC	Unidade formadora de colônia

Vero	Células epiteliais renais de macaco	
XTT	2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) tetrazólio-5- carboxanilida	-2H-

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 <i>Candida auris</i>	15
1.2 BRASIL E <i>Candida auris</i>	17
1.3 BIOFILME	19
1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS	20
1.5 PRODUTOS NATURAIS	22
1.5.1 Eugenol	23
1.5.2 Cinamaldeído	24
1.5.3 Citotoxicidade	25
1.6 PROTEÔMICA	27
2. OBJETIVOS	29
2.1 OBJETIVOS GERAIS	29
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
3. MATERIAL E MÉTODOS	30
3.1 LINHAGENS	30
3.2 PRODUTOS NATURAIS TESTADOS	31
3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	31
3.4 SINERGISMO	32
3.5 PRODUÇÃO DE BIOFILME	32
3.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	35
3.7 ANÁLISE PROTEÔMICA	35
3.7.1 Extração de proteínas	35
3.7.2 Quantificação de Proteínas pelo método de Bradford	36
3.7.3 Digestão de proteínas	37
3.7.4 Análises de Espectrometria de Massas do tipo Shotgun	37
3.7.4 Sequenciamento peptídico por espectrometria de massas	37
3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4. RESULTADOS	39
4.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)	39
4.2 SINERGISMO	41
4.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME	44
4.3.1 Quantificação de biomassa dos biofilmes	44
4.3.2 Atividade metabólica dos biofilmes	45
4.3.3 Ação de eugenol e cinamaldeído na biomassa dos biofilmes	46
4.3.4 Ação de eugenol e cinamaldeído na atividade metabólica de biofilme	53
4.4 Citotoxicidade	59

4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	60
4.5.1 Quantificação proteica.....	60
4.5.2 Proteínas expressas	62
5 DISCUSSÃO.....	83
6 CONCLUSÕES	96
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97

1 INTRODUÇÃO

1.1 *Candida auris*

Candida auris foi identificada pela primeira vez no canal auditivo de uma paciente no Japão em 2009 (Sato et al., 2009). No mesmo ano, foram reportados 15 isolados em pacientes com otite média na Coreia do Sul (Kim et al., 2009). A partir de então foi identificada em todos os continentes, e se tornou uma ameaça global, ocasionando infecções invasivas e surtos em unidades de saúde (Chowdhary et al., 2017; Sears e Schwartz, 2017).

Surgiu de forma simultânea e independente em quatro regiões distintas no planeta. Os isolados são classificados em 5 clados geográficos: clado I, do Sul asiático, clado II, do Leste asiático, clado III, da África do Sul, clado IV, da América do Sul e clado V, do Irã. Os isolados de diferentes clados diferem em dezenas de milhares de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs). Entretanto, em um mesmo clado, os isolados são praticamente indistinguíveis entre eles em relação ao genoma. O ancestral comum mais recente de três dos cinco clados é datado de 1980 (Chow et al., 2020; Muñoz et al., 2021; Ruiz e Lorenz, 2020).

Os isolados dos clados I, III e IV são associados a uma maior prevalência de infecções multirresistentes e surtos em unidades de saúde. Esses isolados apresentam pelo menos uma de três mutações (Y132F, K143R e F126L) no alvo dos azólicos. Os isolados dos clados I e IV também apresentam mutações no gene que codifica a expressão das bombas de efluxo. Cerca de 7% dos isolados dos clados I, III e IV também apresentam resistência às equinocandinas. Por outro lado, o clado II está mais associado às infecções no canal auditivo e apresenta maior susceptibilidade aos fármacos antifúngicos e aos desinfetantes e são mais sensíveis à estressores ambientais (Muñoz et al., 2021).

As mudanças climáticas provavelmente são responsáveis pela emergência de *C. auris* como patógeno causador de infecções em humanos. Acredita-se que a levedura superou a barreira térmica dos mamíferos como adaptação ao aquecimento global e temperaturas mais elevadas dos reservatórios ambientais. Possivelmente, foi transportada de áreas úmidas ou ecossistemas costeiros por animais migratórios, como as aves, para outras áreas do planeta onde ocorreram colonizações em humanos (Garcia-Bustos et al., 2021). Arora et al. (2021) isolaram *C. auris* em um pântano e uma praia arenosa na Índia, sugerindo uma associação com o ecossistema marinho. Escandón (2022) isolou *C. auris* em estuários na Colômbia. Isolados obtidos em locais onde não há atividade humana apresentam susceptibilidade aos antifúngicos e crescimento mais lento a 37°C e 42°C, sugerindo que essa levedura rapidamente se adaptou às temperaturas mais elevadas.

O reservatório ambiental de *C. auris* ainda é desconhecido, seu modo de transmissão também é desconhecido e ainda não definido, mas sabe-se da presença da levedura em ambientes nosocomiais com risco de transmissão horizontal entre os pacientes (Brasil, 2017).

Dentro dos fatores que contribuem para a transmissão é de relevância a colonização prolongada de doentes clínicos e de triagem e a contaminação ambiental. A colonização persistente das pessoas afetadas e a falta de um regime de descolonização resultam num grande reservatório de pessoas que transportam o organismo, sendo que a falta de medidas de controle da infecção amplifica todo o processo (Adams et al., 2018). Estudos mostram que ainda existem dúvidas no que diz respeito ao tempo que indivíduos podem permanecer colonizados e nas medidas que podem ser eficazes para redução da carga fúngica (Berkow et al., 2017; Khan et al., 2017; Tsay et al., 2018).

Embora *C. auris* colonize preferencialmente a pele, já foi isolada do intestino e de mucosas oral e esofágica de indivíduos infectados. Pode ocasionar fungemia, infecções em feridas cirúrgicas e não cirúrgicas, do trato urinário, meningite, miocardite, abscessos cutâneos e infecções ósseas (Bandara e Samaranayake, 2022). Os surtos causados por *C. auris* estão associados à elevadas taxas de mortalidade, especialmente em indivíduos imunocomprometidos (Borman et al., 2016; Chaabane et al., 2019). Foram relatados surtos em diversos países, como Kuwait, México, Omã, Rússia, Arábia Saudita, Espanha e Estados Unidos, atingindo uma mortalidade de cerca de 70% (Moraes, 2022). São comumente reportadas taxas de mortalidade de 30 a 40% associadas à infecção da corrente sanguínea por *Candida*, mesmo em pacientes que receberam tratamento antifúngico, enquanto a taxa geral de mortalidade intra-hospitalar da candidemia por *C. auris* varia de 30% a 60%, e as infecções ocorrem tipicamente várias semanas após a admissão (CDC, 2019).

Sistemas disponíveis comercialmente e métodos tradicionais fenotípicos frequentemente identificam *C. auris* erroneamente como outras espécies, entre elas *C. haemulonni*, *Rhodotorula glutinis*, *Saccharomyces cerevisiae* e menos frequentemente *C. famata*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. doobushaemulonni*, *C. lusitaniae* e *C. albicans* (Garcia-Bustos et al., 2021). A identificação desta levedura deve ser amparada por técnicas que permitam caracterizar com acurácia *C. auris*, como MALDI-TOF (*Matrix Associated Laser Desorption-Ionization*) e/ou sequenciamento da região D1-D2 do DNA ribossômico (rDNA) ou da região interna espaçadora transcrita (ITS) do rDNA (Schelenz et al., 2016). Devido essas dificuldades para identificação e a subnotificação, sua real prevalência e epidemiologia ainda não são totalmente compreendidas (Cortegiani et al., 2018).

Kathuria et al. (2015) analisaram 102 isolados clínicos em Delhi, na Índia, previamente identificados como *C. haemulonii* no período entre 2010 e 2014. Dentre os isolados, 90 foram

confirmados como *C. auris* pelo sequenciamento da região ITS. Os achados foram confirmados por MALDI-TOF. Lee et al. (2011) analisaram seis isolados de casos de fungemia, dos quais dois foram obtidos em 1996 e quatro em 2009 em hospitais universitários da Coreia do Sul, identificados como *C. haemulonni* e *R. glutinis* pelos sistemas VITEK 2 YST e API 20C, respectivamente. Após o sequenciamento das regiões ITS e D1/D2 todos os isolados foram identificados como *C. auris* com 100% de similaridade no GenBank, indicando que a levedura coloniza humanos há pelo menos três décadas.

Os principais fatores de risco predisponentes para a infecção por *C. auris* são similares a outras espécies de *Candida*, pois são patógenos oportunistas. Assim incluem, a hospitalização prolongada, cirurgia abdominal, internamento em unidade de terapia intensiva, doença de base grave e imunossupressão, como malignidade hematológica, tumores sólidos, transplante de medula óssea e HIV, doença renal crônica, presença de cateteres venosos centrais e/ou urinários centrais, cirurgia recente, terapia com corticosteroides, nutrição parentérica, neutropenia, exposição prévia a antibióticos de amplo espectro e terapia antifúngica nos últimos 90 dias de internação (Sardi et al., 2018).

Candida auris possui uma elevada capacidade de colonizar e persistir em superfícies. Welsh et al., (2017) demonstraram que *C. auris* permanece viável em superfícies plásticas por até duas semanas. Esse fator possivelmente está relacionado à tolerância ao estresse ambiental e à formação de biofilmes. A permanência em ambientes hospitalares é potencializada pela resistência aos desinfetantes utilizados nestes locais. (Chaabane et al., 2019). Kean et al. (2018) analisaram a eficácia de NaOCl (hipoclorito de sódio) e ácido paracético em aço inoxidável, polímeros e superfícies de celulose. Ambos os desinfetantes se mostraram eficazes para eliminar células de *C. auris* em todas as superfícies analisadas. Entretanto, algumas células viáveis permaneceram após a aplicação de hipoclorito de sódio em superfícies não porosas. Mesmo com uma exposição prolongada ao desinfetante a uma maior concentração, ocorreu um crescimento residual quando as células foram inoculadas em um meio de cultura rico.

Além da resistência aos compostos desinfetantes, isolados de *C. auris* se mostram pouco sensíveis aos antifúngicos utilizados na clínica. Cerca de 90% dos isolados de *C. auris* são resistentes ao fluconazol, embora as taxas de resistência variem consideravelmente entre os diferentes clados. A taxa de resistência à anfotericina B pode chegar até 30% (Lockhart, 2019).

1.2 BRASIL E *Candida auris*

Em dezembro de 2020 foi notificado a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) o primeiro caso positivo de *C. auris* no Brasil, isolado de ponta de cateter de paciente

internado em uma UTI de um hospital em Salvador/BA. O paciente, de 59 anos e do sexo masculino, sempre morou na região e não tinha histórico de viagens internacionais recentes. Este foi o primeiro caso de um surto com 15 casos, que culminou em dois óbitos (Anvisa, 2020). Uma segunda paciente, do sexo feminino, de 74 anos, também sempre morou na região de Salvador e não tinha histórico de viagens internacionais recentes. Houve a confirmação dos isolados de *C. auris* por meio de espectrometria de massa e análise de dados de sequenciamento da região ITS (*Internal Transcribed Spacer*) de rDNA. Ambos os isolados apresentaram 66% de similaridade com os isolados do clado Sul asiático. Os isolados apresentaram concentrações inibitórias mínimas (CIMs) de 1 µg/mL, 2 µg/mL, 0,03 µg/mL e 0,06 µg/mL para anfotericina B, fluconazol, voriconazol e anidulafungina, respectivamente. Esses dados são diferentes dos encontrados na maioria dos isolados Sul asiáticos. As mutações relacionadas a resistência aos azólicos e equinocandinas estavam ausentes nos genes *ERG11* e *FKS1*. Os isolados ainda não foram suficientemente estressados para se tornarem resistentes e foram introduzidos recentemente no hospital de Salvador. O histórico de restrição de viagens devido à pandemia de COVID-19 leva à hipótese de que a espécie foi introduzida vários meses antes do reconhecimento e/ou emergiu localmente (De Almeida et al., 2021a).

Em outro estudo conduzido por De Almeida et al. (2021b), observou-se que a maioria dos pacientes colonizados por *C. auris* no hospital em Salvador teve culturas de esfregaço de axilas positivas. Também foi verificada uma elevada taxa de positividade de cultura em termômetros digitais. O monitoramento de temperatura com sondas reutilizáveis e termômetros digitais desinfetados de maneira inadequada pode ter contribuído para o surto que ocorreu no hospital após o relato do primeiro caso no Brasil, semelhantemente a um surto que ocorreu no Reino Unido em 2018 (Eyre et al., 2018).

Unidades de Terapia Intensiva sobrecarregadas com pacientes ventilados mecanicamente e com outros procedimentos invasivos, elevada pressão seletiva antibacteriana e antifúngica e reutilização de equipamentos de proteção individual devido à escassez podem levar a disseminação de *C. auris* no contexto da pandemia de COVID-19, como ocorrido nos Estados Unidos, Índia, México, Itália e Líbano (De Almeida et al., 2021b; Eyre et al., 2018). O histórico de restrição de viagens devido à pandemia de COVID-19 levou à hipótese de que a espécie foi introduzida vários meses antes do reconhecimento e/ou emergiu localmente (De Almeida et al., 2021b).

Em dezembro de 2021, a Anvisa recebeu a notificação de outro surto de *C. auris*, que ocorreu em um Hospital da Rede Pública de Salvador/BA. *Candida auris* foi isolada e identificada em uma amostra de urina em paciente de 88 anos, caracterizando o segundo surto (ANVISA, 2021).

Em janeiro de 2022, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) recebeu a notificação e confirmação de dois casos de *C. auris* em um hospital em Pernambuco, caracterizando o terceiro surto do fungo no país (ANVISA, 2022).

Em maio de 2023, foram notificados novos surtos em três hospitais de Pernambuco. Em junho do mesmo ano, foi notificado o primeiro caso no estado de São Paulo, em um recém-nascido. A identificação ocorreu através de uma amostra de swab retal de vigilância, e posteriormente, em hemocultura e urocultura por meio de análises em MALDI-TOF. Com a identificação deste isolado, 77 casos de *C. auris* são totalizados no Brasil (ANVISA, 2023).

1.3 BIOFILME

Os fatores de virulência de um microrganismo são atributos que contribuem para a sua patogenicidade, causando doença no hospedeiro. Frequentemente, esses fatores contribuem para a sobrevivência do organismo em ambientes inóspitos, permitindo sua multiplicação e sobrevivência. Dentre os fatores de virulência comuns em espécies de *Candida*, destacam-se a capacidade de alterar seu fenótipo e morfologia, formação de hifas e pseudo-hifas, evasão do sistema imune, capacidade de evasão e a formação de biofilmes (Watkins et al., 2022).

Os biofilmes produzidos por espécies do gênero *Candida* são de relevância clínica e estão associados à resistência adaptativa aos antifúngicos e a elevadas taxas de mortalidade e morbidade. *Candida auris* sobrevive e persiste em superfícies, incluindo aço e plástico, por até quatro semanas e formam biofilmes altamente resistentes, cuja formação é associada à falha de tratamento e à recorrência de infecções crônicas (Rajendran et al., 2012). Os biofilmes produzidos por *C. auris* são constituídos predominantemente por leveduras em brotamento e pseudo-hifas, diferentemente dos biofilmes produzidos por *C. albicans*, que são predominantemente constituídos por hifas (Sherry et al., 2017).

Os pacientes acometidos por infecções invasivas causadas por *C. auris* são frequentemente submetidos a procedimentos médicos, como implantação de cateteres venosos e urinários e tubos para alimentação parenteral. Esses dispositivos parecem desempenhar um importante papel na patogênese da candidemia causada por esta espécie. As infecções de corrente sanguínea possivelmente estão associadas com a formação de biofilmes nas extremidades de cateteres, ocasionando sua disseminação através dos vasos sanguíneos (Sayeed et al., 2020).

Há quatro estágios na formação de biofilmes por *C. auris*. Na adesão, as células planctônicas em forma de levedura aderem a superfícies bióticas, como pele e mucosas, ou abióticas, incluindo cateteres e próteses. Na iniciação, as células começam a proliferar e a formar pseudo-hifas. Na fase de maturação, a multiplicação continua e ocorre a formação de

uma matriz extracelular que envolve as células do biofilme. Na fase de dispersão, algumas células se desprendem do biofilme e aderem em novas superfícies, formando novos biofilmes, ou caem na corrente sanguínea (Bapat e Nobile, 2021).

Durante a formação de biofilmes, a levedura secreta polissacarídeos de manana e glucana para formar uma barreira isolando-o do ambiente externo. As células ancoram-se à uma superfície por meio de adesina. Quando o biofilme se ancora, as camadas passam a se espessar e formam uma barreira, a qual o sistema imune do hospedeiro e os antifúngicos não conseguem acessar. Além disso, as bombas de efluxo são superativadas em biofilmes, auxiliando na expulsão de agentes antifúngicos. É comum que biofilmes estabelecidos há mais tempo sejam pan-resistentes, ou seja, apresentem resistência à todas as três classes de antifúngicos disponíveis. Essas estruturas de resistência também são responsáveis pela disseminação nosocomial, incluindo a dispersão por meio dos profissionais de saúde (Kean e Ramage, 2019; Watkins et al., 2022).

Por meio de análises transcriptômicas, verificou-se que *C. auris* regula positivamente as adesinas CSA1, IFF4, PGA24 e PGA 26 ao formar e manter biofilmes. Com o amadurecimento do biofilme, as proteínas transportadoras CDR1, SNQ2 e YHD3 são ativadas. É provável que as proteínas ALS1 e ALS5 contribuam para a adesão durante a formação de biofilme, entretanto, nessa espécie, a quantidade de proteínas do grupo ALS é menor do que em *C. albicans*, fator que pode estar relacionado ao fato de biofilmes formados por *C. albicans* serem mais robustos (Watkins et al., 2022).

Além dos mecanismos de resistência aos antifúngicos, os biofilmes de *C. auris* também apresentam menor susceptibilidade aos desinfetantes utilizados em ambientes hospitalares. Diversos produtos que normalmente alteram a viabilidade celular, causam danos ao material genético, alterações metabólicas e danos à parede celular, não são capazes de alterar a viabilidade de *C. auris*, não impedem a proliferação e não previnem a regeneração de biofilme, representando um sério risco à desinfecção adequada desses ambientes. A espécie também apresenta menor susceptibilidade aos desinfetantes à base de quaternários de amônio, que são comumente utilizados em ambientes de assistência à saúde (Cadnum et al., 2017; Ledwoch e Maillard, 2019).

1.4 RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS

A incidência de doenças causadas por fungos aumentou consideravelmente nos últimos anos. Estima-se que ocorram cerca de 300 milhões de infecções fúngicas potencialmente fatais anualmente, resultando em 1,7 milhões de mortes. As terapias atuais apresentam limitações,

como toxicidade, baixa biodisponibilidade e aumento de resistência. (Beardsley et al., 2018; Gow et al., 2022).

A pressão exercida pelo uso de antifúngicos seleciona microrganismos intrinsecamente resistentes ou esses microrganismos podem adquirir resistência durante terapias prolongadas (Gow et al., 2022). O uso de antifúngicos agrícolas também está relacionado com o aumento da resistência, sendo que os azólicos utilizados na agricultura compartilham o mesmo alvo de ação dos fármacos utilizados clinicamente (Barber et al., 2020). Shelton et al. (2022) avaliaram a resistência ao tebuconazol, um dos compostos fungicidas mais utilizados no Reino Unido. Cerca de 15% dos isolados avaliados eram resistentes ao antifúngico, o que confere resistência cruzada com os fármacos utilizados para tratar doenças em humanos e animais. Yadav et al. (2022) avaliaram a presença de leveduras em maçãs armazenadas e que foram tratadas com fungicidas agrícolas. Mais de 70% das leveduras isoladas nas superfícies das frutas pertencem ao gênero *Candida* e cerca de 11% foram identificadas como *C. auris*. Com exceção de um isolado, todos apresentaram resistência ao fluconazol. Esses isolados também apresentaram baixa susceptibilidade aos fungicidas triazólicos agrícolas. Foi observada resistência cruzada entre os fungicidas agrícolas e os antifúngicos utilizados para tratar infecções em humanos e animais.

Atualmente são utilizadas cinco classes de fármacos para tratar as infecções causadas por fungos. A classe dos polienos, que inclui a anfotericina B, que interage com o ergosterol presente na membrana plasmática destes organismos, formando poros e resultando na liberação de glicose e dos íons K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} e Cl^- . Apresenta ação fungicida contra espécies de *Candida*, *Aspergillus flavus* e *A. fumigatus*. Os azólicos inibem a ação da 14- α -demetilase, impedindo a conversão de lanosterol em precursores do ergosterol, apresentando geralmente efeito fungistático contra leveduras. As equinocandinas impedem a síntese de 1,3- β -D-glucana, um importante componente da parede celular. Essa classe de antifúngico apresenta ação fungicida para espécies de *Candida*. A 5-flucitosina, um análogo sintético da citosina, interfere na síntese de DNA. A griseofulvina interage com os microtúbulos, impedindo a divisão celular. É utilizada para tratar infecções causadas por dermatófitos (Aris et al., 2017; Houst et al., 2020).

Uma das grandes preocupações relacionadas à *C. auris* é sua multirresistência às principais classes de antimicrobianos usados no tratamento de infecções fúngicas. Em geral, *C. auris* é resistente ao fluconazol, equinocandinas (anidulafungina, caspofungina, micafungina) e à anfotericina B (Forsberg et al., 2019).

Os mecanismos moleculares associados à evasão dos antifúngicos por isolados de *C. auris* são semelhantes aos relatados para outras espécies. A resistência aos azólicos está associada à superexpressão de bombas de efluxo e alterações na síntese de ergosterol, através

de mutações em *ERG11*, *Y132F* e *K143R*. A resistência às equinocandinas é atribuída às mutações no gene *FKS1*. Os polimorfismos de nucleotídeo único em genes relacionados à síntese de ergosterol são relacionados à resistência aos polienos. A substituição do aminoácido fenilalanina por isoleucina (F211I) no gene *FUR1*, importante para a metabolização da 5-flucitosina é responsável pela resistência em análogos de nucleosídeos (Bandara e Samaranayake, 2022; Rhodes et al., 2018).

Devido ao perfil multirresistente de isolados de *C. auris*, devem ser realizados testes de suscetibilidade antes de iniciar a terapêutica, sendo a microdiluição preconizada pelo “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)” e “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)” a metodologia mais utilizada e recomendada como padrão ouro. Porém, ainda não estão estabelecidos valores de referência definitivos (“breakpoints”) para a categorização de resistências em *C. auris*.

Com base na evidência clínica, enquanto os resultados dos testes de sensibilidade estão pendentes, a primeira linha de tratamento são as equinocandinas, não estando recomendada a terapia antifúngica combinada numa fase inicial da infecção (TSAY *et al.*, 2018). Quando não há sucesso no uso deste antifúngico, a anfotericina B é utilizada.

1.5 PRODUTOS NATURAIS

A incidência crescente de infecções fúngicas invasivas graves provocadas por fungos oportunistas tem sido alvo de constante preocupação, acarretando a busca por tratamentos cada vez mais eficazes e drogas cada vez mais seguras (Bentubo e Gompertz, 2014). Porém, aumento da variedade de patógenos associados com infecções fúngicas não tem encontrado correspondência com o número de agentes antifúngicos disponíveis para tratamento. O desenvolvimento de terapias antifúngicas diminuiu, infelizmente, pois a indústria farmacêutica tem dado menor atenção à essas patologias.

As limitações na eficácia e na tolerância destes agentes em uso, falha na resposta clínica, grande toxicidade, crescente tolerância por microrganismos e as poucas opções terapêuticas atuais no mercado, tem estimulado a pesquisa de novas substâncias com potencial antifúngico, tais como os produtos de origem natural (Fuentefria *et al.*, 2017; Padovan *et al.*, 2019).

Os produtos naturais têm sido amplamente estudados nos últimos anos devido ao seu potencial farmacológico. As plantas medicinais, produtos vegetais e derivados de óleos essenciais são utilizados como componentes de medicamentos tradicionais devido ao seu potencial farmacológico. Em geral, os componentes com atividade biológica nesses compostos são fenilpropanóides, alcalóides, terpenóides e quinonas. Cerca de 65% dos compostos

orgânicos aprovados para uso humano nos últimos quarenta anos correspondem a produtos naturais ou derivados. (Arif et al., 2009; Moraes, 2022).

Óleos essenciais são compostos voláteis extraídos de raízes, tronco, casca, caules, folhas, flores e frutos de plantas. São amplamente utilizados em produtos farmacêuticos, cosméticos, alimentos e produtos químicos. (Ju et al., 2020; Qian et al., 2020). Gupta et al., (2018) verificaram que os óleos essenciais de cravo e canela, cujos principais compostos ativos são eugenol e cinamaldeído, respectivamente, são capazes de eliminar até 80% do biofilme produzido por *C. glabrata*, além de inibir o crescimento de células planctônicas em concentrações que variam de 64 a 128 µg/mL, bem como aumentar a geração de espécies reativas de oxigênio, lise celular e diminuição da quantidade de ergosterol. Essas observações sugerem que esses compostos podem reduzir a integridade da membrana celular.

1.5.1 Eugenol

O eugenol (2-metoxi-4-(2-propenil) fenol) é um composto, presente em óleos essenciais de plantas das famílias *Lamiaceae*, *Laureaceae*, *Myrtaceae* e *Myristicaceae* e o principal composto do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*). É extraído principalmente de *Ocimum tenuiflorum*, *Cassia fistula*, *Zieria smithii* e *Pimenta racemosa*. Quimicamente o eugenol é classificado como um terpenóide, da classe dos monoterpenos, apresentando atividade antioxidante, analgésica, antimutagênica, antiplaquetária, antialérgica e anti-inflamatória. Demonstra ação antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, parasitas, incluindo *Giardia lamblia* e contra fungos (Ju et al., 2020; Marchese et al., 2017; Qian et al., 2020).

Em um estudo conduzido por Jianhua e Hai (2009) foi avaliada a sensibilidade de *C. albicans* ao eugenol por meio da citometria de fluxo. O crescimento celular, bem como o índice de proliferação, foi inibido proporcionalmente à elevação da concentração do produto. O produto comprometeu a integridade da membrana, indicando que a morfologia celular sofreu alterações, reduzindo seu tamanho. Por análise de fluorescência, também foi possível observar uma perda de segmento de DNA.

Sharifzadeh e Shokri (2020) avaliaram a ação do eugenol em isolados de *C. krusei* e *C. tropicalis*. Para a primeira espécie, a concentração inibitória mínima variou entre 200 e 400 µg/mL. Já para *C. tropicalis*, os valores variaram entre 400 - 800 µg/mL. A combinação com voriconazol diminuiu a CIM desse antifúngico de 7,77 µg/mL para 0,41 µg/mL em *C. krusei*. Mais de 80% dos isolados de *C. tropicalis* e 70% dos isolados de *C. krusei* analisados foram

susceptíveis à combinação entre eugenol e voriconazol, demonstrando uma ação sinérgica entre esses produtos, e não houve ação antagonista para nenhum dos isolados.

Lone et al., (2020) demonstraram que a tosilação do eugenol no grupo hidroxila resulta em moléculas com maior atividade antifúngica. As concentrações inibitórias mínimas variaram entre 0,125 - 512 µg/mL. Também foi observado um aumento na quantidade de células apoptóticas e despolarização da membrana mitocondrial de acordo com a dose empregada do composto, indicando a ativação de vias necróticas. Biernasiuk et al., (2023) obtiveram CIMs variando entre 0,25 e 4 mg/mL de eugenol para *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 2091, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. glabrata* ATCC 90030 e *C. krusei* ATCC 14243 e trinta isolados clínicos de *Candida spp.* não *albicans* obtidos de pacientes hospitalizados com doenças hematológicas. Também foi demonstrada uma ação do eugenol em combinação com o cloreto de cetilpiridínio, clorexidina e triclosan, ambos compostos antissépticos.

He et al., (2007) demonstraram que o eugenol apresenta ação inibitória na formação de biofilmes por *C. albicans* dose-dependente e impede a formação de hifas. Com uma exposição de 48 horas em uma concentração de 500 µg/mL o eugenol não eliminou completamente as células do biofilme, mas reduziu a atividade metabólica em cerca de 80%. Células expostas à uma concentração de 200 µg/mL produziram biofilmes compostos principalmente por leveduras e pouca filamentação, enquanto em exposição à uma concentração de 2000 µg/mL, o biofilme formado apresentava apenas algumas leveduras.

1.5.2 Cinamaldeído

O cinamaldeído é um dos principais compostos encontrados no óleo essencial de canela. Apresenta ação antioxidante, anti-inflamatória, imunomoduladora, antidiabética, regenerativa, antibacteriana e antiviral. É capaz de inibir a atividade da cicloxigenase-2, induzida por IL-1beta, justificando sua ação anti-inflamatória e estimula a produção de fator de necrose tumoral (TNF) induzida por IL-8, resultando em sua ação anticancerígena. Apresenta atividade antifúngica contra *Aspergillus flavus* e *A. niger* (Shreaz et al., 2016).

Em um estudo conduzido por Thirapanmethee et al. (2021), cinamaldeído apresentou uma potente atividade antimicrobiana contra isolados de *Acinetobacter baumannii* multirresistentes. Todos os 25 isolados apresentaram CIMs variando entre 0,01 - 0,04% (v/v). Também apresentou efeito sinérgico com colistina e imipenem em ensaios de fração inibitória mínima. O tratamento com cinamaldeído por 8 horas alterou a morfologia de *A. baumannii* de cocos para células alongadas e a divisão celular foi interrompida.

Bang et al., (2000) verificaram que o trans-cinamaldeído inibe a atividade da β -1,3-glucana sintase e da quitina sintase em *Saccharomyces cerevisiae* com concentrações inibitórias

de 0,84 e 1,44 mM, respectivamente. Saracino et al., (2022) verificaram a ação do cinamaldeído em 18 isolados de *Candida spp.*, sendo 15 de *C. albicans*, dois de *C. glabrata* e um de *C. lusitanae*. O composto levou à perda de células viáveis em até 4 horas, com CIM variando entre 20,48 e 163,80 µg/mL. Em combinação com o eugenol, cinamaldeído apresenta efeito aditivo por meio do método de checkerboard.

Shreaz et al., (2011) analisaram a ação do cinamaldeído em 18 isolados de *Candida spp.* incluindo *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. guilliermodii*. Foram realizados ensaios de microdiluição, difusão de discos e curvas de crescimento. Todos os isolados foram sensíveis ao cinamaldeído, com CIMs variando entre 100 e 400 µg/mL. Todos os isolados apresentaram halos de inibição significativos com o tratamento com o composto majoritário e as curvas de crescimento mostraram uma atividade fungicida dependente da concentração de cinamaldeído. Miranda-Cadena et al. (2021a) demonstraram que biofilmes de *Candida spp.* tratados com cinamaldeído apresentaram hifas deformadas e redução do número de células em comparação ao biofilme não tratado. O produto também foi capaz de reduzir a atividade metabólica na fase de adesão dos biofilmes, conforme verificado por meio da leitura das microplacas após a adição de 2,3-bis (2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil) -2H- tetrazólio-5- carboxanilida (XTT).

Alves et al., (2020) demonstraram alterações na micromorfologia de espécies de *Candida*, onde foi possível observar a formação de hifas e clamidoconídios na ausência de tratamento. Entretanto, ao utilizar 37,83 µM de cinamaldeído, ocorreram mudanças na forma filamentosa, prejudicando o desenvolvimento celular, com rara formação de pseudo-hifas e ausência de clamidoconídios. O composto também foi capaz de reduzir a formação de biofilme de 64,52 para 33,75% com concentrações variando entre 151,3 e 378,3 µM.

1.5.3 Citotoxicidade

Dentre as principais vantagens dos produtos fitoquímicos destacam-se a sua disponibilidade, diversidade de produtos químicos e baixos preços. Os produtos naturais têm sido amplamente estudados para o tratamento de diversas doenças. Entretanto, uma elevada quantidade desses produtos não é aprovada nas fases de testes pré-clínicos e clínicos devido à toxicidade (Patra et al., 2018). Atsumi et al., (2005) avaliaram a citotoxicidade do eugenol e isoeugenol por meio do método MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) em células HSG (células de glândula submandibular humana), demonstrando que o primeiro composto apresenta menor citotoxicidade do que o isoeugenol.

Teles et al., (2021) analisaram a atividade antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de cravo-da-Índia (*Syzygium aromaticum*) e do eugenol e verificaram que a concentração citotóxica para 50% das células quando tratadas com óleo essencial foi maior que 1000 µg/mL

em macrófagos peritoneais de camundongo BALB/c, enquanto para o eugenol foi de 292,7 µg/mL. A atividade citotóxica do eugenol também foi avaliada em células cancerígenas e não cancerígenas por Ranjitkar et al., (2021). O composto não afetou a viabilidade celular de fibroblastos e células HeLa até a concentração de 400 µg/mL. Nesse estudo também foi analisada a citotoxicidade do carvacrol para ambas as células. Esse composto se mostrou mais citotóxico em relação ao eugenol em concentrações a partir de 100 µg/mL. Trans-cinamaldeído não apresentou citotoxicidade para ambos os tipos celulares em concentrações menores que 200 µg/mL.

Lopes et al., (2018) verificaram que o eugenol não é tóxico para neutrófilos humanos através do teste de MTT nas concentrações de 5, 10, 50 e 100 µg/mL. Os dados foram confirmados por meio da análise por citometria de fluxo, onde foi analisada a integridade de membrana celular utilizando o corante iodeto de propídio, que penetra apenas em células com alterações na membrana, emitindo fluorescência vermelha quando excitado a 488 nm. Para esse ensaio, foram utilizadas concentrações de 10, 25 e 50 µg/mL, cujos resultados confirmam que não houve ruptura celular. A possível atividade citotóxica da nanoemulsão de eugenol também foi avaliada através do método de MTT em macrófagos murinos, em concentrações até 200 µg/mL e não houve redução da viabilidade celular (Islamuddin et al., 2016).

Cheng et al., (2022) avaliaram a citotoxicidade da combinação de cinamaldeído com nanopartículas de prata e quitosana, observando-se uma viabilidade celular de pelo menos 90%. De acordo com a norma ISO-10993-5, uma amostra não é considerada tóxica quando a viabilidade celular é de pelo menos 70%. A citotoxicidade de óleo essencial de canela e emulsão foi avaliada por Ganic et al., (2022) em células MRC-5. A viabilidade celular variou entre 7 e 90% para o óleo essencial e entre 6 e 77% para a emulsão, de acordo com a concentração empregada.

O cinamaldeído é amplamente utilizado em cosméticos e como saborizante na indústria alimentícia. A Organização Mundial da Saúde (OMS) permite que até 0,7 mg/kg sejam ingeridas diariamente. A toxicidade aguda apresenta valores de dose letal para 50% da população entre 0,6 e mais de 2 g/kg para várias espécies (Shreaz et al., 2016).

Cesur et al., (2023) produziram adesivos de nanofibras contendo cinamaldeído e gentamicina para evitar o desenvolvimento de ceratite microbiana. Essas estruturas foram incubadas com fibroblastos embrionários de camundongo e não houve redução da viabilidade celular. Panjaitan et al., (2022) avaliaram a eficácia antibiofilme do extrato etanólico da canela e a citotoxicidade também em fibroblastos. A viabilidade celular se manteve em torno de 90% para a maior parte das concentrações de extrato avaliadas. Feng et al., (2023) verificaram a ação e segurança de uma nanoemulsão de cinamaldeído. A toxicidade foi avaliada em zebra-fish e

células epiteliais humanas BEAS-2B. A viabilidade celular foi de mais de 95% após o tratamento. Os resultados em zebra-fish também atestaram a segurança da nanoemulsão.

Cinamaldeído não apresenta citotoxicidade para eritrócitos humanos em concentrações entre 62,5 e 4000 μ M. Entretanto, uma baixa toxicidade foi observada para células HaCat (queratinócitos humanos imortalizados), resultando em uma viabilidade celular de cerca de 73% após 48 horas de exposição (Brustolin et al., 2022). Sharma et al., (2017) verificaram que a exposição à combinação de timol e cinamaldeído em células Vero, através de ensaio de MTT, resulta em uma viabilidade celular de cerca de 78%.

1.6 PROTEÔMICA

Ensaios proteômicos têm sido utilizados para determinar possíveis mecanismos de ação de produtos naturais com potencial atividade antifúngica. Piatek et al., (2022) utilizaram esses ensaios para verificar a ação de um composto de prata em *C. parapsilosis*. Foi observado um aumento de proteínas relacionadas às bombas de efluxo, como resposta ao estresse celular e diminuição de proteínas ribossômicas e outras proteínas relacionadas à transcrição, tradução e alongamento de proteínas, além da diminuição da formação de biofilme na etapa de adesão.

Muthamil et al., (2020) verificaram os mecanismos de ação do ácido oleico derivado de *Murraya koenigii* em *C. albicans* por meio de análises proteômicas. Seus alvos de ação são as proteínas envolvidas no metabolismo da glicose, biossíntese de ergosterol e aminoácidos, produção de lipase e homeostase de ferro. Ao formar as redes de interação entre proteínas, foi possível observar que a maioria das proteínas reguladas de maneira diferencial em relação ao controle sem tratamento estão relacionadas a funções moleculares, correspondendo a cerca de 35% das interações, seguido de proteínas relacionadas à processos biológicos, correspondendo a 33% das interações. Por fim, cerca de 31% das interações correspondem a proteínas relacionadas à síntese de componentes celulares.

Neto et al., (2018) verificaram os possíveis mecanismos de ação de naftofuranquinonas em *C. tropicalis*. Foi observado um aumento na expressão de proteínas envolvidas na resposta ao estresse metabólico, metabolismo energético, glicólise e processos de montagem de proteínas e tradução. O composto também ocasionou danos ao DNA.

A ação de β - citronelol em *C. albicans* também foi avaliada por meio de análises proteômicas. As proteínas alteradas em relação ao controle relacionavam-se à atividade catalítica, regulação de funções moleculares, estrutura e regulação da tradução. Nas interações entre proteínas foi possível observar a supressão de proteínas relacionadas à síntese de componentes da parede celular, como *rtbi1*, *Als2p* e 1,3,-beta-glucanosiltransferase *PGA4*. Proteínas relacionadas à resposta ao estresse oxidativo foram reguladas negativamente, como

superóxido-dismutase, glutathione S-transferase e proteína de estresse DDR48. A síntese de proteínas relacionadas à síntese de ATP foi reduzida. Por outro lado, o tratamento ocasionou um aumento na síntese de proteínas de choque térmico, como hsp30p, hsp90 e proteínas ribossômicas (Buakaew et al., 2022).

Prasath et al., (2019) verificaram através de análises proteômicas os possíveis mecanismos de ação de ácido mirístico em biofilmes produzidos por *C. albicans*. O composto atua em proteínas relacionadas à virulência, como síntese de ergosterol e lipídeos, além do metabolismo de fármacos e resistência, bem como o estresse oxidativo. Acetil-CoA C-acetiltransferase-*erg10* e proteína de controle de captação de esterol 2-*upc2*, proteínas relacionadas à síntese proteica, foram reguladas negativamente. Serina/treonina fosfatase-*sit4* também foi regulada negativamente, comprometendo o desenvolvimento de hifas. CDR1, relacionada ao transporte de fármacos também foi regulada negativamente. Proteínas relacionadas à esporulação e patogenicidade, como quitinase – 4 (*cht4*) e quitina sintase-3 (*chs3*) também foram reguladas negativamente.

Análises proteômicas também foram utilizadas para determinar os possíveis mecanismos de ação das sementes de *Luffa operculata* em *C. albicans* e *C. krusei*. Cerca de 30% das proteínas estão relacionadas com a defesa aos agentes ambientais estressores, 29% correspondem ao metabolismo energético, 4% ao desenvolvimento embrionário, 4% à metilação, 8% correspondem ao dobramento e metabolismo de proteínas e 18% das proteínas apresentam funções desconhecidas. As sementes são capazes de formar poros na membrana celular das leveduras e causar um aumento de compostos reativos de oxigênio (Silva et al., 2022).

Ye et al., (2023) verificaram a ação de ácido trichoderma em *C. albicans*. Foi observado que a membrana mitocondrial, retículo endoplasmático, ribossomos das mitocôndrias e parede celular foram rompidos. O rompimento dessas estruturas causou um aumento de reativos de oxigênio no interior das células, o que ocasionou danos ao DNA. Proteínas relacionadas à membrana celular e metabolismo de cisteína e metionina foram reguladas negativamente, sugerindo que os danos à membrana celular e no metabolismo de aminoácidos pode ser os mecanismos de ação do composto.

C. auris tornou-se uma séria ameaça à saúde pública por sua rápida capacidade de desenvolver resistência aos antifúngicos disponíveis e permanência em superfícies bióticas e abióticas. Diante do exposto, é fundamental o estudo de compostos com potencial antifúngico. Os produtos naturais têm sido amplamente estudados por conta de sua elevada diversidade de compostos bioativos. Eugenol e cinamaldeído apresentam ação frente espécies de fungo

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a atividade antifúngica, citotoxicidade e os possíveis mecanismos de ação dos produtos naturais eugenol e cinamaldeído em isolados clínicos de *C. auris*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em isolados clínicos de *C. auris* frente aos antifúngicos de uso clínico (anfotericina B, caspofungina e itraconazol) e aos produtos naturais (eugenol e cinamaldeído);
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) em isolados clínicos de *C. auris* frente aos antifúngicos de uso clínico (anfotericina B, caspofungina e itraconazol) e aos produtos naturais (eugenol e cinamaldeído);
- Verificar as possíveis interações sinérgicas entre eugenol e cinamaldeído e entre cada um dos produtos com os antifúngicos de uso clínico;
- Verificar a capacidade de eugenol e cinamaldeído de reduzirem a biomassa de biofilmes produzidos por *C. auris*;
- Verificar a capacidade dos produtos naturais de reduzirem a atividade metabólica de biofilmes produzidos por *C. auris*;
- Avaliar a citotoxicidade de eugenol e cinamaldeído em células renais de primata;
- Verificar os possíveis mecanismos de ação de eugenol e cinamaldeído através de análise proteômica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 LINHAGENS

Foram estudadas 25 amostras clínicas de *C. auris*, obtidas em parceria com o Departamento de Microbiologia Médica e Doenças Infecciosas do Hospital Canisius Wilhelmina, em Nijmegen, Holanda e com o Instituto Adolfo Lutz. Também foram adicionadas ao estudo uma cepa de *C. auris* CDC B11903 e uma cepa isolada na Bahia referente ao primeiro surto no Brasil. A tabela 1 descreve as regiões de isolamento das cepas bem como os clados geográficos a que pertencem. (Lockhart et al 2022; Chow et al., 2020; Spruijtenburg et al., 2022).

Tabela 1. Procedência e características filogenéticas das cepas de *C. auris* estudadas.

Cepa	Procedência	Clado
1	Índia	I ¹
2	Kwait	I
3	India	I
4	Omã	I
5	Paquistão	I
6	Japão	II ²
7	Japão	II
8	Japão	II
9	África do Sul	III ³
10	África do Sul	III
11	Venezuela	IV ⁴
12	África do Sul	III
13	Nigéria	IV
14	Colômbia	IV
15	Colômbia	IV
16	Colômbia	IV
17	Irã	V ⁵
18	Irã	V
19	Irã	V
20	Irã	V
21	Japão	II
22	Japão	II
23	África do Sul	III
24	Espanha	III
25	Irã	V
CDC B11903	-	-
Isolado Bahia	Brazil	-

¹ Clado I: do sul asiático; ²Clado II: do Leste asiático; ³Clado III: da África do Sul; ⁴Clado IV: da América do Sul; ⁵Clado V: do Irã

3.2 PRODUTOS NATURAIS TESTADOS

Os compostos cinamaldeído e eugenol e os antifúngicos anfotericina B, itraconazol e caspofungina foram adquiridos da indústria química e biotecnológica Sigma-Aldrich®.

3.3. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Para determinação da CIM de anfotericina B, caspofungina e itraconazol foi utilizada a metodologia descrita no documento do EUCAST (EUCAST, 2022). Foram adicionados 100 µL de meio RPMI-1640 tamponado com MOPS 0,165 M aos poços de microplacas de 96 wells contendo concentrações de antifúngico variando entre 0,015625 e 16 µg/mL. Foram adicionados 100 µL de inóculo contendo uma densidade celular de $1-5 \times 10^5$ UFC/mL. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Foi preparado um controle negativo (RPMI-1640 sem inóculo), um positivo (inóculos sem os produtos antimicrobianos) e um estéril (RPMI-1640 com os produtos antimicrobianos). Os resultados foram visualizados através da leitura em leitor de microplacas (Biotech Epoch-2, software Gen5) a 530 nm. Após o período de incubação, foram realizadas subculturas dos poços em ágar Sabouraud-dextrose para determinação da CFM. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicatas. Como controle do ensaio, além das cepas estudadas, também foram incluídas as cepas de referência *C. parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258). Os pontos de corte para *C. auris* foram definidos com base em publicação do Centers for Disease Control and Prevention (CDC-EUA, 2020) conforme mencionado na tabela 2.

Para determinação da CIM de eugenol e cinamaldeído foi utilizada a metodologia de microdiluição como descrita no documento M27 (CLSI, 2017). Foram adicionados 100 µL de meio RPMI-1640 tamponado com MOPS [ácido 3 (N-morfolino) propanosulfônico] 0,165 M aos poços de microplacas de 96 wells contendo concentrações de eugenol e cinamaldeído variando entre 1,95 e 4000 µg/mL. Os inóculos foram padronizados na escala 0,5 McFarland, diluídos a 1:50 e posteriormente 1:20, obtendo-se uma concentração de 10^3 a 5×10^3 UFC/mL e adicionados aos poços. As placas foram incubadas a 37° C por 48 horas. Foi preparado um controle negativo (RPMI-1640 sem inóculo), um positivo (inóculos sem os produtos antimicrobianos) e um estéril (RPMI-1640 com os produtos antimicrobianos). Os resultados foram visualizados com auxílio de um espelho. Após o período de incubação, foram realizadas subculturas dos poços em ágar Sabouraud-dextrose para determinação da CFM. As placas foram incubadas a 37° C por 24 horas. Os ensaios foram realizados em duplicatas. Como controle do ensaio, além das cepas estudadas, também foram incluídas as cepas de referência *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *C. krusei* (ATCC 6258).

Tabela 2. Pontos de cortes provisórios (CDC-USA, 2020) para interpretação de testes de sensibilidade para isolados de *C. auris*.

Fármaco antifúngico	CIMs provisórios (pontos de corte) (µg/mL)
Fluconazol	≥32
Voriconazol e outros triazólicos de 2ª geração	NA
Anfotericina B	≥2
Anidulafungina	≥4
Caspofungina	≥2
Micafungina	≥4

NA: não avaliado

3.4 SINERGISMO

Para verificação das interações sinérgicas, foram construídas curvas de sobrevivência para um representante de cada clado geográfico, para o isolado da Bahia e para CDC B11903. Foram utilizadas ¼ da CIM dos compostos cinamaldeído e eugenol e ¼ da CIM de fármacos comumente utilizados para o tratamento de infecções causadas por fungos. Após a adição dos produtos antifúngicos ao meio RPMI-1640 e adição do inóculo, as microplacas de ELISA foram incubadas em um leitor (Biotech Epoch-2, software Gen5) por 24 horas a 35° C. As leituras foram realizadas a 530 nm a cada duas horas. Concomitantemente, placas foram incubadas na estufa nas mesmas condições. Foram tomadas alíquotas nos tempos 0 e 48 horas e semeadas em placas de ágar Sabouraud-dextrose para determinar se as combinações entre os produtos e os antifúngicos foram fungistáticas ou fungicidas. As colônias foram contadas com o auxílio de um contador de colônias digital e com os valores de Densidade Óptica (DO) e Log de UFC/mL foram construídas curvas de sobrevivência no GraphPad Prism 5.00 (CLSI, 2015; EUCAST, 2020; Sun et al., 2017).

3.5 PRODUÇÃO DE BIOFILME

Com o propósito de verificar a habilidade das amostras de leveduras em produzir biofilme, foi utilizada metodologia preconizada por Jin *et al.* (2003), Pierce *et al.* (2008) e Cordeiro *et al.* (2015). As amostras foram cultivadas em ágar Sabouraud dextrose a 37°C por 24 horas. A partir do crescimento obtido foi preparado um inóculo padronizado com 3 mL de caldo Sabouraud dextrose suplementado com 8% de glicose, sendo a turbidez compatível a escala 0,5 de MacFarland (1×10^6 células/mL). Alíquotas de 100 µL do inóculo foram

transferidas para a placa de poliestireno em triplicada. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por um período de 4 horas para o tempo de adesão das células no substrato. Após incubação as placas foram aspiradas e lavadas duas vezes com Phosphate Buffer Solution (PBS) para a remoção das células não aderidas. Após, foram adicionados 100 µL do meio caldo Sabouraud dextrose com 8% de glicose em cada poço, e uma nova incubação em temperatura de 37°C foi realizada por um período máximo de 48 horas para que ocorresse a maturação dos biofilmes. Após este período foram verificadas a quantidade de biomassa e a atividade metabólica dos biofilmes. Os testes foram realizados na ausência (controle) e na presença (tratamento) dos produtos naturais.

3.5.1 Quantificação da biomassa dos biofilmes

Após a incubação, as placas foram novamente lavadas por duas vezes com PBS. Posteriormente foram adicionados 100 µL de metanol 100% para desidratação do biofilme. Após 15 minutos, o metanol foi retirado e as placas foram dispostas no fluxo laminar para secagem a temperatura ambiente. Finalizando esta etapa, 200 µL de cristal violeta a 0,3% foram adicionados em cada poço e as placas foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. O corante foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada. Para remoção do corante impregnado nos biofilmes, foram adicionados 150 µL de ácido acético 33% em cada poço, e o sobrenadante foi transferido para novas placas de poliestireno com fundo chato para leitura em espectrofotômetro a 595 nm. Os valores de absorbância dos controles negativos foram subtraídos dos valores observados pelas cepas testadas, minimizando-se assim possíveis interferências. A quantificação da produção de biofilme foi relatada como a média aritmética dos valores de absorbância das triplicatas (Cordeiro et al., 2015; Jin et al., 2003; Pierce et al., 2008).

Para categorizar a produção de biofilme os isolados foram considerados como fracos produtores ($A_{590} \leq 0.300$), produtores moderados ($A_{590} = 0.300$ a 0.499) e fortes produtores ($A_{590} \geq 0,500$) (Miranda-Cadena et al., 2021a).

3.5.1.1 Tratamento dos biofilmes com produtos naturais

Para o tratamento dos biofilmes, suspensões contendo 1×10^6 células/mL foram adicionadas aos poços das placas de 96 poços, conforme descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 37°C por 4 horas para adesão das células. Após o período de incubação, os poços foram lavados duas vezes com Phosphate Buffer Solution (PBS) para a remoção das células não aderidas. Foram adicionadas soluções de 100 µL contendo 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol e cinamaldeído. As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para maturação

do biofilme. Para quantificação da biomassa de biofilme, as placas foram novamente lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 100 µL de metanol 100% aos poços da placa para desidratação do biofilme. Após 15 minutos, o metanol foi retirado e as placas secaram em temperatura ambiente. Após a secagem, 200 µL de cristal violeta a 0,3% foram adicionados aos poços e as placas foram incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. O corante foi removido e as placas foram lavadas duas vezes com água destilada. Foram adicionados 150 µL de ácido acético 33% em cada poço e os sobrenadantes foram transferidos para uma nova placa de poliestireno para leitura em espectrofotômetro a 595 nm. A porcentagem de redução de biofilme foi calculada em relação aos controles sem tratamento (Cordeiro et al., 2015; Jin et al., 2003; Pierce et al, 2008).

3.5.2 Atividade metabólica dos biofilmes

Após o período de incubação, as placas foram lavadas com PBS duas vezes e foram adicionados 200 µL de PBS estéril em cada poço. Foram adicionados 12 µL de uma solução de menadiona-XTT em cada poço. As placas foram incubadas por 5 horas a 37° C ao abrigo de luz. Após o período de incubação, foram transferidos 100 µL do conteúdo dos poços para novas placas de poliestireno de fundo chato. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 480 nm. A quantificação da produção de biofilme foi relatada como a média aritmética dos valores de absorbância das triplicatas (Cordeiro et al., 2015; Jin et al., 2003; Pierce et al, 2008).

Os biofilmes foram caracterizados de alta atividade metabólica quando a absorbância foi superior a 0,500. A atividade metabólica foi considerada moderada quando a absorbância variou entre 0,300 e 0,499 e considerada baixa quando a absorbância foi menor que 0,300 (Miranda-Cadena et al., 2021a).

3.5.2.1 Tratamento dos biofilmes com produtos naturais

Para o tratamento dos biofilmes, suspensões contendo 1×10^6 células/mL foram adicionadas aos poços das placas de 96 poços, conforme descrito anteriormente. As placas foram incubadas a 37°C por 4 horas para adesão das células. Após o período de adesão, os poços foram lavados com 200 µL de PBS estéril. Foram adicionadas soluções de 200 µL contendo 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol e cinamaldeído após o período de adesão. Foram adicionados 12 µL de uma solução de menadiona-XTT em cada poço. As placas foram incubadas por 5 horas a 37° C ao abrigo de luz. Após o período de incubação, foram transferidos 100 µL do conteúdo dos poços para novas placas de poliestireno de fundo chato. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 480 nm. A porcentagem de redução de biofilme foi

calculada em relação aos controles sem tratamento (Cordeiro et al., 2015; Jin et al., 2003; Pierce et al, 2008).

3.6 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Para este ensaio, foi utilizada a linhagem celular Vero ATCC CCL-81, obtida em parceria com o Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, câmpus de Botucatu. As células foram cultivadas em Opti-MEM (Gibco[®]) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução contendo anfotericina B e penicilina em estufa a 37°C com 5% de CO₂.

Os ensaios para verificação de citotoxicidade foram realizados de acordo com a metodologia adaptada de Mosman et al., (1986). Foram preparadas suspensões com 2×10^4 células/mL e adicionados 100 µL dessa suspensão em cada poço de placas de 96 poços para adesão durante 24 horas. Após esse período, o meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 100 µL de soluções de eugenol e cinamaldeído nas concentrações de 15,625, 31,25, 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL. Após a adição dos tratamentos, as placas foram incubadas por 48 horas. Posteriormente, as soluções contendo os produtos foram aspiradas e foram adicionados 100 µL de solução contendo 10% de MTT (brometo de 3-4,5-dimetil-tiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio) e as placas foram incubadas por mais três horas para metabolização do MTT. Após esse período, a solução de MTT foi aspirada e foram adicionados 100 µL de DMSO para rompimento das células. As placas foram lidas em um leitor de microplacas a 580 nm e foram construídos gráficos no GraphPad Prism 5.00 com os valores obtidos para verificação da viabilidade celular.

3.7 ANÁLISE PROTEÔMICA

Para a análise proteômica foi selecionada a cepa CDC B11903. Foram preparadas amostras: controle, tratada com eugenol, com cinamaldeído, itraconazol, combinação entre eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol. Foram utilizadas concentrações subinibitórias de ambos os produtos na preparação das amostras, que foram incubadas por 48 horas a 37°C com caldo Sabouraud-dextrose antes da extração de proteínas.

3.7.1 Extração de proteínas

As amostras foram solubilizadas em 500 µL tampão Uréia 7M, Tiouréia 2M. Em seguida, adicionou-se seis esferas (beads) de zircônia 1.4mm e uma bead de aço 2.8mm e as amostras foram submetidas à três ciclos de 1 minuto e 20 segundos sob agitação na velocidade de 4350 rpm, intercalados por 1 minuto de intervalo na temperatura de 4°C (amostra reservada

em gelo), utilizando o equipamento disruptor de células e tecidos L-BEADER 6 (Loccus). A amostra foi centrifugada a 10.000 x g, por 30 minutos a 4°C e os sobrenadantes foram transferidos para um microtubo de baixa retenção LoBind (Eppendorf). As proteínas presentes nas amostras foram precipitadas na presença de acetato de amônio 100mM/metanol na proporção 1:5 (v/v). Essas misturas foram submetidas ao vórtex novamente e incubadas à -20° por 16 horas. A seguir, as amostras foram centrifugadas a 6.000 x g por 30 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram solubilizados com acetato de amônio 10mM/metanol na proporção 1:5 sob agitação constante até a solubilização completa do sobrenadante. As misturas foram incubadas por 1 hora à -20°C e, novamente, realizou-se uma centrifugação por 30 minutos, conforme a etapa anterior, sendo que os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram solubilizados com Acetona 100% (v/v) até a total solubilização dos mesmos. Essas misturas permaneceram em repouso por 1 hora à -20°C, e após esta etapa foram centrifugadas conforme descrito anteriormente. Os sobrenadantes foram descartados e os pellets foram secos à temperatura ambiente para evaporação total da acetona. Os pellets foram ressolubilizados com tampão Uréia 7M, Tiouréia 2M, CHAPS 4% (m/v), DTT 1% (m/v), utilizando-se o mínimo de tampão para a solubilização completa dos pellets.

3.7.2 Quantificação de Proteínas pelo método de Bradford

As proteínas presentes no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Bradford (1976). Para isso uma placa de microtitulação de 96 poços foi utilizada. Na placa foi colocada em triplicata a proteína padrão comercial albumina bovina (BSA) como a proteína conhecida para titulação. A proteína BSA estava na concentração 1 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, e para a construção da curva de calibração do método, foram utilizadas diluições com as massas de 1 μg , 2 μg , 4 μg e 6 μg da proteína. Após a aplicação da proteína BSA, utilizamos água ultrapura para completarmos o volume para 160 μL /poço. Também fizemos uma triplicata do branco da curva que corresponde a 160 μL de água. Após a pipetagem e mistura realizando movimentos up-down com a ponteira da pipeta, adicionamos 40 μL do reagente de Bradford (Bio Rad) a cada poço, obtendo um volume final em cada poço de 200 μL . Este protocolo seguiu as recomendações do fabricante que pede que haja uma proporção de 1:5 do reagente de Bradford com o volume final da amostra (40 μL :200 μL). Após a adição do reagente, novamente realizamos a mistura com movimentos up-down da pipeta e aguardamos 5 minutos para que a reação ocorresse. Em seguida, a placa foi lida em Espectrofotômetro μQuant , no comprimento de onda 595 nm.

3.7.3 Digestão de proteínas

Cinquenta microgramas (50 µg) foram separados em microtubos plásticos de baixa retenção do tipo Lobind (Eppendorf) e assim, procedeu-se à digestão trípica. As amostras foram complementadas com o tampão Bicarbonato de Amônio 50 mM (Merck) até que completassem 60 µL de volume final. Posteriormente, adicionou-se 25 µL da solução RapiGest SF 0,2% (código 186001861, Waters). A amostra foi submetida ao vórtex, centrifugada e submetida à 37°C por 60 min. Posteriormente foram adicionados 2,5 µL de DTT 100 mM (Merck), as amostras foram agitadas em vórtex, centrifugadas (pulso) e colocadas em um bloco aquecido a 37°C, onde foram incubadas por 40 min. Após esta etapa adicionou-se 2,5 µL de Iodoacetamida 300 mM (Merck), as amostras foram agitadas em vórtex, centrifugadas (pulso) e transferidas para um local escuro e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos. Após estas etapas a enzima Tripsina (Promega) foi adicionada (1:50 [enzima:substrato]) e imediatamente incubadas a 37°C por 16 horas. No dia seguinte a reação enzimática foi paralisada com 10 µL de TFA 5% (v/v) (Merck), foram agitadas em vórtex, centrifugadas (pulso) e incubadas a 37°C por 90 min. Posteriormente foram centrifugadas a 9757 g, por 30 minutos a temperatura ambiente. Assim, os sobrenadantes de cada amostra foram transferidos para um novo microtubo plástico de baixa retenção do tipo Lobind (Eppendorf).

3.7.4 Análises de Espectrometria de Massas do tipo Shotgun

As análises de espectrometria de massas foram realizadas por meio de um equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado à um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: A) ácido fórmico 0,1% [v/v] em água LCMS e B, ácido fórmico 0,1% [v/v] em acetonitrila 80% [v/v]. Os peptídeos foram carregados em uma pré-coluna C18, 30 µm x 5 mm (Código 164649, ThermoFisher Scientific), e dessalinizados num gradiente isocrático de 4%B por 3 minutos à um fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprosil-Pur C18-AQ, 3 µm, 120 Å, 105 mm, Código 1PCH7515-105H354-NV, PICOCHIP) utilizando um gradiente linear de 4-55%B por 30 min, 55% a 90%B por 1 min, mantido à 90%B por 5 minutos e reequilibrado à 4%B por 20 minutos à um fluxo de 300 nL/min. A ionização foi obtida utilizando uma fonte Nanospray ion source (PICOCHIP). O modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. Os espectros MS foram adquiridos de m/z 200 à m/z 2000, resolução de 70.000 e 100 ms de tempo de injeção. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35% com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e

exclusão dinâmica de 10 s. Os dados de espectrometria foram adquiridos por meio do software Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

3.7.5 Análises de bioinformática

Os dados brutos de espectrometria de massas no formato RAW foram submetidos ao software PatternLab [versão 4.0.0.84] (Carvalho et al, 2016) para a obtenção da identificação das proteínas. Os principais parâmetros utilizados nesta ferramenta foram: banco de dados UNIPROT (Taxonomy *Candida auris*), enzima tripsina; permissão de 2 clivagens perdidas; modificação pós-traducional carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (False Discovery Rate) máxima foi considerada de $\leq 1\%$.

Uma matriz compatível com o programa MetaboAnalyst 4.0® (<https://www.metaboanalyst.ca/>) foi construída a partir dos dados proteômicos utilizando as contagens espectrais de cada proteína identificada, as quais foram normalizadas para cada proteína pela média ponderada das triplicatas técnicas de cada amostra (Chong et al, 2014). Proteínas que foram identificadas em menos de 20% das amostras foram excluídas da análise. Análises de *Partial Least Squares* (PLS) foram utilizadas como o principal método de análise multivariada. Apenas os sinais presentes em 80% das amostras foram considerados para a geração dos modelos estatísticos.

As proteínas foram submetidas à análise de enriquecimento por meio da classificação de Ontologia Genética (*Gene Ontology* - GO) tais como “função molecular”, “processo biológico”, “componente celular” e “vias de sinalização”, assim como as interações das proteínas também foram investigadas utilizando a ferramenta de bioinformática ShinyGO 0.80 (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>).

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados por análise de variância de uma via (ANOVA), seguido de teste Tukey, com $p < 0,05$ quando apresentaram distribuição normal e analisados pelo teste Kruskal-Wallis, seguido do teste Dunn's com $p < 0,05$ quando os dados não apresentaram distribuição normal no GraphPad Prism 5.0.

4. RESULTADOS

4.1 CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

As tabelas 3 e 4 apresentam os valores de CIM e CFM, respectivamente, para eugenol, cinamaldeído, itraconazol, anfotericina B e caspofungina. A CIM variou entre 31,25 e 250 µg/mL para o eugenol, entre 31,25 e 62,5 µg/mL para cinamaldeído, entre 0,625 e 1280 µg/mL para itraconazol e 0,015 à 0,06 µg/mL para caspofungina. A CIM da anfotericina B foi de 0,625 µg/mL para todos os isolados. Os valores de CFM apresentaram as mesmas variações dos valores de CIM, com exceção da anfotericina B, que variou entre 0,625 e 5 µg/mL. Todas as amostras testadas mostraram sensibilidade frente a anfotericina B e caspofungina. Para itraconazol não existem *breakpoints* definidos, mas os valores observados de CIM foram elevados.

Dezenove dos isolados quando expostos à caspofungina apresentaram o efeito Eagle (indicados na tabela 3). Foi possível observar que em baixas concentrações de antifúngico não ocorreu crescimento, bem como nas concentrações mais elevadas. Entretanto, em concentrações intermediárias foi possível observar um crescimento em relação às demais concentrações.

Tabela 3. Valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL para eugenol, cinamaldeído, itraconazol, anfotericina B e caspofungina.

Cepa	CIM eugenol (µg/mL)	CIM cinamaldeído (µg/mL)	CIM itraconazol (µg/mL)	CIM anfotericina B (µg/mL)	CIM caspofungina (µg/mL)
1	125	31,25	640	0,625	0,03*
2	125	31,25	1280	0,625	0,015*
3	125	62,5	640	0,625	0,06
4	125	62,5	640	0,625	0,015
5	125	31,25	640	0,625	0,015*
6	31,25	31,25	640	0,625	0,015
7	62,5	31,25	640	0,625	0,015*
8	125	62,5	1280	0,625	0,03*
9	125	31,25	1280	0,625	0,06
10	125	31,25	640	0,625	0,06
11	125	62,5	640	0,625	0,015*
12	62,5	31,25	80	0,625	0,015
13	125	31,25	20	0,625	0,03*
14	125	31,25	640	0,625	0,015*
15	125	31,25	160	0,625	0,06*
16	62,5	31,25	640	0,625	0,03*
17	125	31,25	2,5	0,625	0,06
18	62,5	31,25	640	0,625	0,03*
19	125	62,5	20	0,625	0,06*
20	125	31,25	2,5	0,625	0,015*
21	62,5	31,25	0,625	0,625	0,015
22	125	62,5	80	0,625	0,015*
23	125	31,25	10	0,625	0,03*
24	125	62,5	80	0,625	0,015*
25	125	31,25	5	0,625	0,015*
Isolado Bahia	250	62,5	160	0,625	0,03*
CDC B11903	125	31,25	160	0,625	0,015*

*Isolados que apresentaram o fenômeno Eagle.

Houve significância estatística quando $p < 0,05$.

Tabela 4. Valores de Concentração Fungicida Mínima (CFM) em µg/mL para eugenol, cinamaldeído, itraconazol, anfotericina B e caspofungina.

Cepa	CFM eugenol (µg/mL)	CFM cinamaldeído (µg/mL)	CFM itraconazol (µg/mL)	CFM anfotericina B (µg/mL)	CFM caspofungina (µg/mL)
1	125	31,25	640	0,625	0,06
2	125	31,25	1280	0,625	1
3	125	62,5	640	0,625	0,25
4	125	62,5	640	0,625	0,015
5	125	31,25	640	0,625	0,03
6	31,25	31,25	640	0,625	0,015
7	62,5	31,25	640	0,625	0,015
8	125	62,5	1280	0,625	0,03
9	125	31,25	1280	0,625	0,03
10	125	31,25	640	0,625	0,125
11	125	62,5	640	5	1
12	62,5	31,25	80	0,625	0,06
13	125	31,25	20	0,625	0,125
14	125	31,25	640	0,625	0,015
15	125	31,25	160	0,625	0,06
16	62,5	31,25	640	0,625	0,125
17	125	31,25	2,5	0,625	0,06
18	62,5	31,25	640	0,625	0,125
19	125	62,5	20	0,625	0,06
20	125	31,25	2,5	0,625	0,06
21	62,5	31,25	0,625	0,625	0,015
22	125	62,5	80	0,625	0,03
23	125	31,25	10	0,625	0,03
24	125	62,5	80	0,625	2
25	125	31,25	5	0,625	0,015
Isolado Bahia	250	62,5	160	0,625	0,06
CDC B11903	125	31,25	160	0,625	0,03

Houve significância estatística quando $p < 0,05$.

4.2 SINERGISMO

O sinergismo foi testado com os produtos naturais e itraconazol, uma vez que este antifúngico apresentou os maiores valores de CIM quando comparados com aqueles apresentados pela anfotericina B e caspofungina, frente as quais *C. auris* apresentou sensibilidade.

Na figura 1 são apresentadas as curvas de sobrevivência com as interações sinérgicas entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol. Na figura 1 (A), observa-se uma interação sinérgica fungistática entre eugenol e cinamaldeído para o isolado representante do clado I, em que a redução de log de UFC/mL foi menor que 5. Observa-se interação sinérgica fungicida entre eugenol/itraconazol e cinamaldeído/ itraconazol, onde ocorreu redução de log de UFC/mL maior que 5.

Em relação ao isolado representante do clado II, foram observadas interações, sendo que a redução de log de UFC/mL foi menor que 5 entre o eugenol e cinamaldeído, determinando

uma interação fungistática até 24 horas de incubação. Entre eugenol/itraconazol e cinamaldeído/itraconazol, houve uma redução de log de UFC/mL maior que 5, caracterizando uma interação sinérgica fungicida (Figura 1 (B)).

Na figura 1 (C), observam-se as interações sinérgicas para o isolado representante do clado III. Houve redução de log de UFC/mL maior que 5 nas combinações entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol, caracterizando interação sinérgica fungicida.

Foram observadas interações sinérgicas para o isolado representante do clado IV. A curva correspondente à combinação entre eugenol e cinamaldeído apresentou um crescimento menor em relação ao controle, caracterizando uma interação sinérgica fungistática. As interações entre eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol apresentaram redução de log de UCF/mL maior que 5, caracterizando interação sinérgica fungicida (Figura 1 (D)).

Na figura 2 (E) são observadas as interações sinérgicas para o isolado representante do clado V. Houve uma interação fungistática entre eugenol e cinamaldeído até 24 horas de incubação. As interações entre eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol foram fungicidas, apresentando uma redução de log de UFC/mL maior que 5.

A figura 2 (F) mostra as interações sinérgicas para o isolado clínico da Bahia. Houve redução de log de UFC/mL maior que 5 para todas as interações, caracterizando uma atividade fungicida entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol.

Interações sinérgicas para a cepa CDC B11903 também foram observadas (Figura 2 (G)). A redução de log de UFC/mL foi maior para todas as interações, caracterizando uma atividade fungicida entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol.

Os resultados foram estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

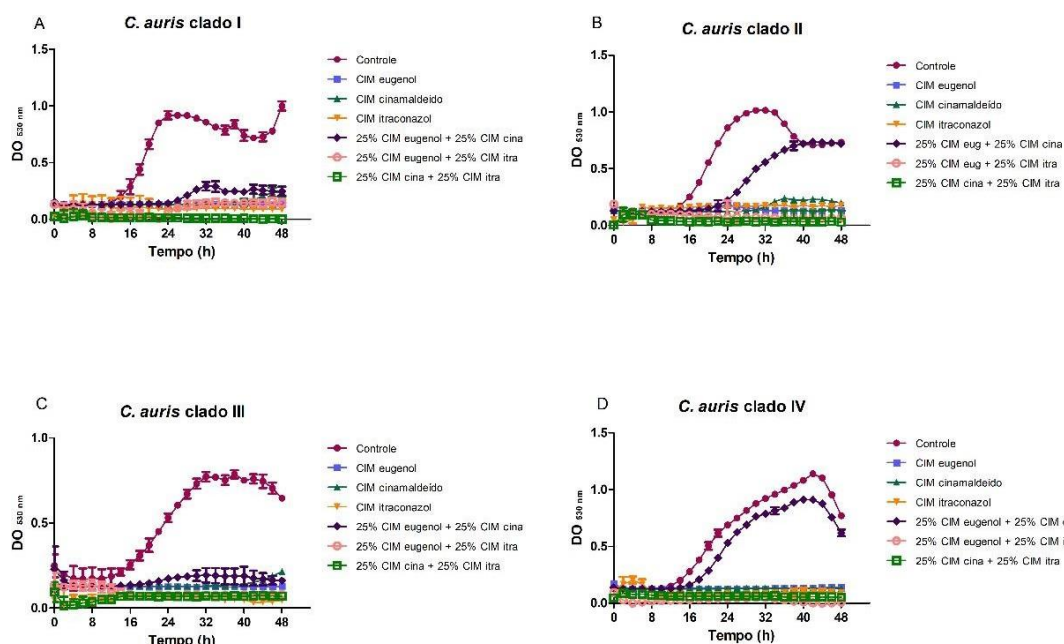


Figura 1. Interações sinérgicas entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol para os representantes dos clados I, II, III e IV.

Curvas de sobrevivência para o isolado representante do clado I. Houve interação sinérgica fungistática entre o eugenol e cinamaldeído e interação fungicida entre eugenol e itraconazol e entre cinamaldeído e itraconazol (A). Curvas de sobrevivência para o isolado representante do clado II. Houve interação sinérgica fungistática entre o eugenol e cinamaldeído e interação fungicida entre eugenol e itraconazol e entre cinamaldeído e itraconazol (B). Curvas de sobrevivência para o isolado do clado III. Houve interação sinérgica fungicida entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol (C). Curvas de sobrevivência para o isolado representante do clado IV. Houve interação sinérgica fungistática entre eugenol e cinamaldeído e interação fungicida entre eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol (D). Houve significância estatística quando $p < 0,05$.

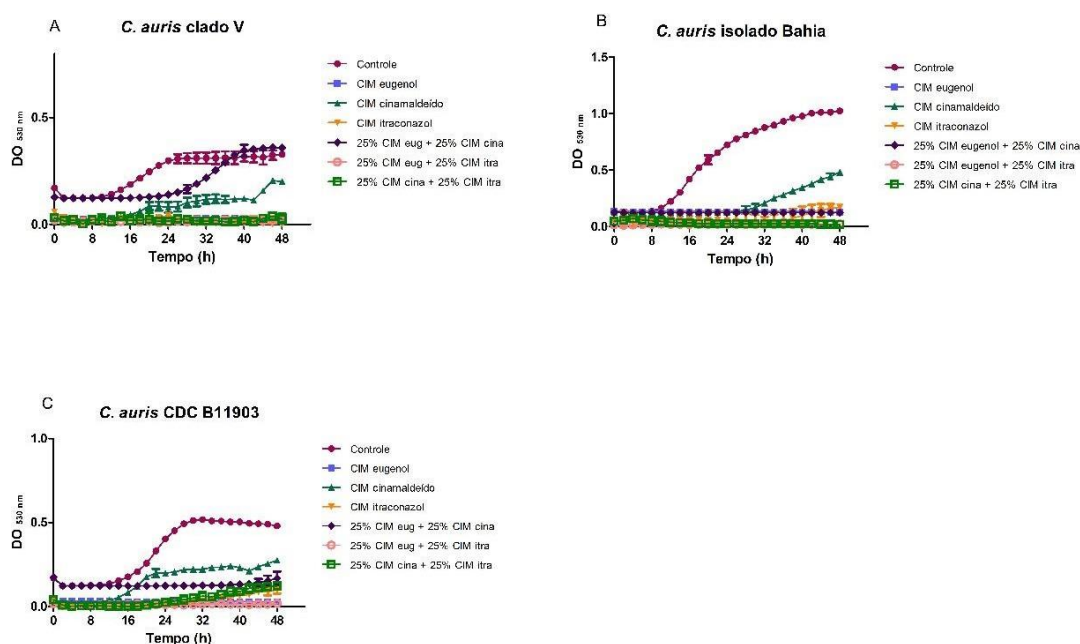


Figura 2. Interações sinérgicas entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol para o representante do clado V, isolado da Bahia e CDC B11903.

Curvas de sobrevivência para o isolado representante do clado V. Houve interação sinérgica fungicida entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol (A). Curvas de sobrevivência para o isolado clínico da Bahia. Houve interação sinérgica fungicida entre o eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol (B). Curvas de sobrevivência para a cepa CDC B11903. Houve interação sinérgica fungicida entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol (C). Houve significância estatística quando $p < 0,05$.

4.3 PRODUÇÃO DE BIOFILME

4.3.1 Quantificação de biomassa dos biofilmes

Na tabela 5 são apresentados os valores de absorvância de biomassa de biofilme por meio da técnica de cristal violeta a 590 nm. As cepas foram classificadas de acordo com a produção de biomassa de biofilme. Todas as amostras mostraram-se forte produtoras de biofilme.

Tabela 5. Quantificação de biofilme com cristal violeta a 590 nm.

Cepa	Absorbância (590 nm)	Classificação
1	0,870	Forte produtor
2	1,211	Forte produtor
3	1,441	Forte produtor
4	1,78	Forte produtor
5	1,37	Forte produtor
6	1,413	Forte produtor
7	0,859	Forte produtor
8	1,318	Forte produtor
9	1,705	Forte produtor
10	2,03	Forte produtor
11	2,09	Forte produtor
12	2,836	Forte produtor
13	1,56	Forte produtor
14	1,08	Forte produtor
15	1,237	Forte produtor
16	1,519	Forte produtor
17	1,155	Forte produtor
18	1,32	Forte produtor
19	1,566	Forte produtor
20	1,447	Forte produtor
21	0,533	Forte produtor
22	1,57	Forte produtor
23	1,946	Forte produtor
24	0,867	Forte produtor
25	1,139	Forte produtor
Isolado Bahia	1,106	Forte produtor
CDC B11903	2,159	Forte produtor

4.3.2 Atividade metabólica dos biofilmes

Na tabela 6, são apresentados os valores de absorbância de atividade metabólica de biofilme por XTT a 486 nm. As cepas foram classificadas em baixa, moderada e elevada atividade de biofilme. A maioria das amostras apresentou atividade metabólica moderada (15/27 - 55,5%), seguida por baixa atividade (11/27 – 40,8%) e elevada atividade (1/27 – 3,7%)

Tabela 6. Verificação de atividade metabólica de biofilme com XTT a 486 nm.

Cepa	Absorbância (486 nm)	Classificação
1	0,344	Atividade moderada
2	0,328	Atividade moderada
3	0,29	Baixa atividade
4	0,166	Baixa atividade
5	0,267	Baixa atividade
6	0,195	Baixa atividade
7	0,354	Atividade moderada
8	0,325	Atividade moderada
9	0,332	Atividade moderada
10	0,290	Baixa atividade
11	0,334	Atividade moderada
12	0,168	Baixa atividade
13	0,304	Atividade moderada
14	0,301	Atividade moderada
15	0,292	Baixa atividade
16	0,173	Baixa atividade
17	0,389	Atividade moderada
18	0,176	Baixa atividade
19	0,350	Atividade moderada
20	0,36	Atividade moderada
21	0,158	Baixa atividade
22	0,542	Elevada atividade
23	0,39	Atividade moderada
24	0,192	Baixa atividade
25	0,425	Atividade moderada
Isolado Bahia	0,303	Atividade moderada
CDC B11903	0,363	Atividade moderada

4.3.3 Ação de eugenol e cinamaldeído na biomassa dos biofilmes

Foram selecionadas 11 amostras para verificar a ação dos produtos naturais sobre a quantificação da biomassa de biofilmes.

Nas figuras 3 e 4 são apresentados gráficos com a porcentagem de inibição de formação de biofilmes tratados com eugenol. O isolado 3 (Fig. 3a) apresentou uma redução de biofilme de cerca de 62% quando tratado com 75% da CIM do produto, enquanto a redução foi de cerca de 67% e 72% com 50% e 25% da CIM, respectivamente. O isolado 4 (Fig. 3b) apresentou uma redução de 32% quando tratado com 75% da CIM, enquanto a redução foi de 22% com 50% da CIM. Não houve redução na produção de biofilme quando tratado com 25% da CIM. O isolado 6 (Fig. 3c) apresentou uma redução de 60% na produção de biofilme quando tratado com 75%

da CIM, enquanto a redução foi de 64% e 41% quando os biofilmes foram tratados com 50% e 25% da CIM, respectivamente. O isolado 10 (Fig. 3d) apresentou uma redução de 53% na produção de biofilme quando tratado com 75% da CIM de eugenol, enquanto a redução de biofilme foi de 45% e 37% quando tratados com 50% e 25% da CIM, respectivamente. O isolado 11 (Fig. 3e) apresentou uma redução de 49% de biofilme quando tratado com 75% da CIM de eugenol, de 64% quando tratado com 50% da CIM e de 52% quando tratado com 25% da CIM. O isolado 12 (Fig. 3f) apresentou uma redução de 45% quando tratado com 75% da CIM de eugenol, de 17% quando tratado com 50% da CIM e de 29% quando tratado com 25% da CIM.

O isolado 13 (Fig. 4a) apresentou uma redução de 44% quando tratado com 75% da CIM de eugenol, de 50% com 50% da CIM e de 12% com 25% da CIM de eugenol. O isolado 19 (Fig. 4b) apresentou uma redução de 40% de biofilme quando tratado com 75% da CIM de eugenol, de 35% com 50% da CIM e de 24% com 25% da CIM de eugenol. O isolado 22 (Fig. 4c) apresentou uma redução de biofilme de 50% com 75% da CIM de eugenol, enquanto para 50% e 25% da CIM, os valores de inibição foram de 26% e 9%, respectivamente. O isolado 25 (Fig. 4d) apresentou uma inibição de 41% de biofilme quando tratado com 75% da CIM de eugenol, de 35% quando tratado com 50% da CIM e de 29% quando tratado com 25% da CIM. A cepa CDC B11903 (Fig. 4e) apresentou uma inibição na formação de biofilme de 40% quando tratado com 75% da CIM de eugenol, de 7,4% quando tratado com 50% da CIM e de 42% quando tratado com 25% da CIM de eugenol.

Nas figuras 5 e 6 são apresentados gráficos com a porcentagem de inibição da formação de biofilme tratados com cinamaldeído. O isolado 3 (Fig. 5a) apresentou uma redução de 61% de biofilme quando tratado com 75% da CIM de cinamaldeído. A redução foi de 28% e 62% quando tratados com 50% e 25% da CIM, respectivamente. O isolado 4 (Fig. 5b) apresentou uma redução de 51%, 48% e 45% quando tratado com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído, respectivamente. O isolado 6 (Fig. 5c) apresentou inibição de biofilme de 74%, 86% e 67% quando os biofilmes foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM, respectivamente. O isolado 10 (Fig. 5d) apresentou redução da formação de biofilme de 75%, 79% e 63% quando os biofilmes foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído, respectivamente. O isolado 11 (Fig. 5e) apresentou redução de biofilme de 74%, 71% e 70% quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído, respectivamente. O isolado 12 (Fig. 5f) apresentou uma redução de biofilme de 71% quando tratado com 75% da CIM de cinamaldeído, enquanto a redução foi de 68% quando tratado com 50% da CIM e de 63% quando tratado com 25% da CIM.

Foi observada uma redução de 56%, 51% e 52% na formação de biofilme quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído, respectivamente, para o isolado 13 (Fig. 6a). Para o isolado 19 (Fig 6b), foi observada uma redução de biofilme de 60%, 37% e 32% quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído. O isolado 22 (Fig. 6c) apresentou uma inibição de biofilme de 12%, 13% e 7% quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído. O isolado de 25 (Fig. 6d) apresentou uma inibição de biofilme de 70%, 69% e 68% quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído. Foi observada uma redução de biofilme de 38%, 30% e 10% quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM da cinamaldeído para a cepa CDC B11903 (Fig. 6e).

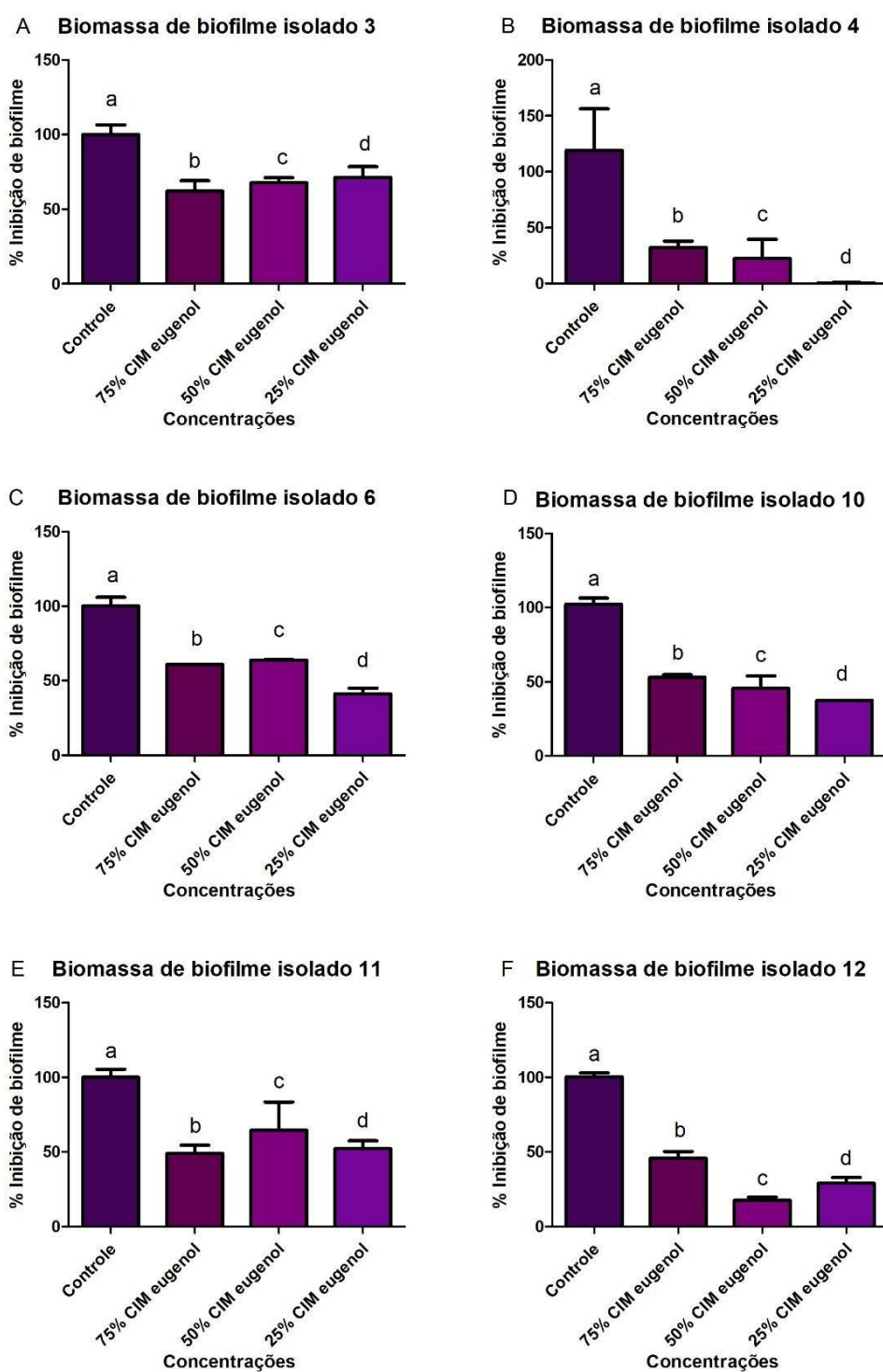


Figura 3. Inibição da formação de biomassa de biofilme por eugenol para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12. Inibição da produção de biomassa de biofilme por eugenol para o isolado 3 (A), isolado 4 (B), isolado 6 (C), isolado 10 (D), isolado 11 (E) e isolado 12 (F).

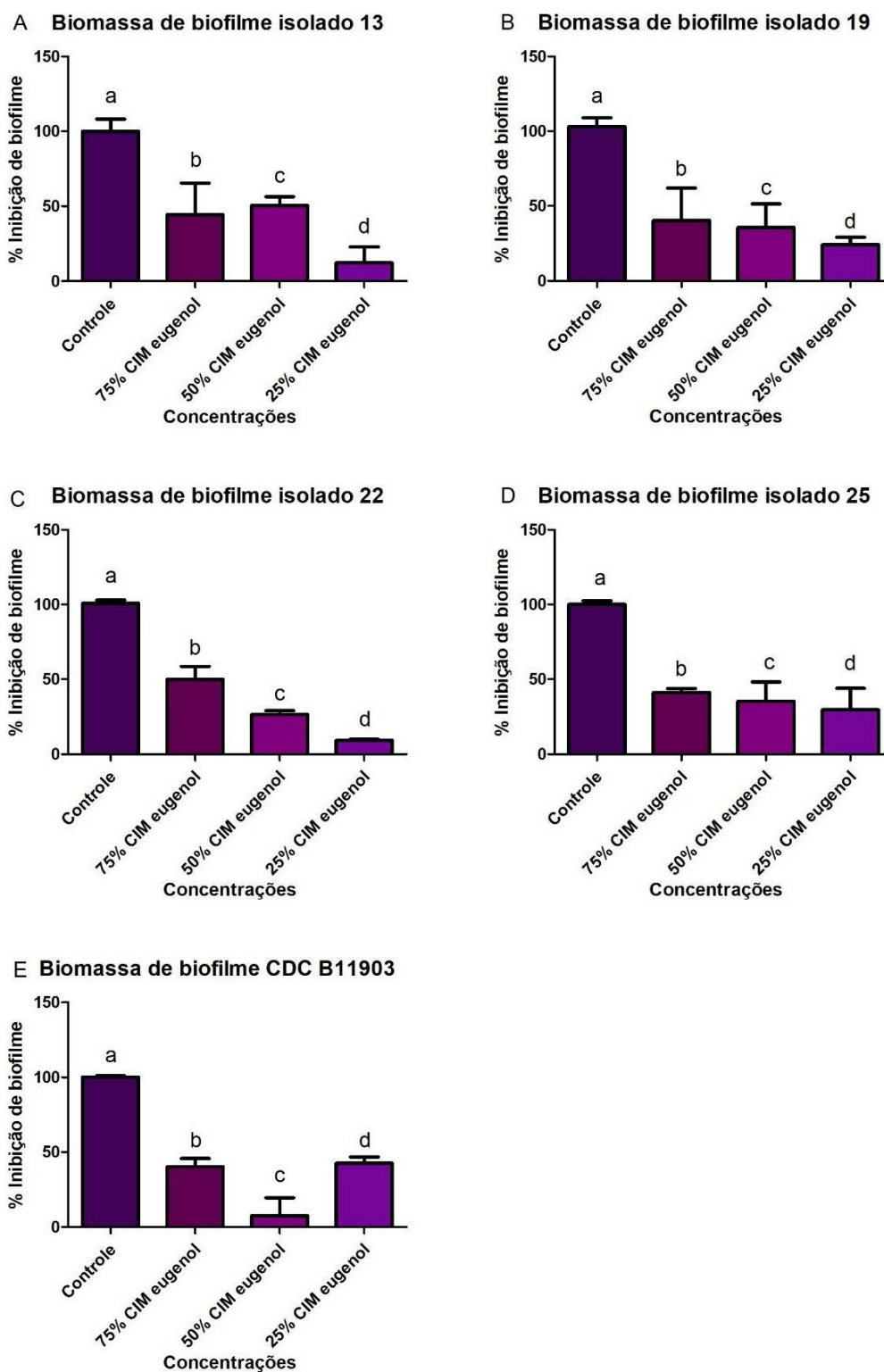


Figura 4. Inibição da formação de biomassa de biofilme por eugenol para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903. Inibição da produção de biomassa de biofilme por eugenol para o isolado 13 (A), isolado 19 (B), isolado 22 (C), isolado 25 (D) e CDC B11903 (E).

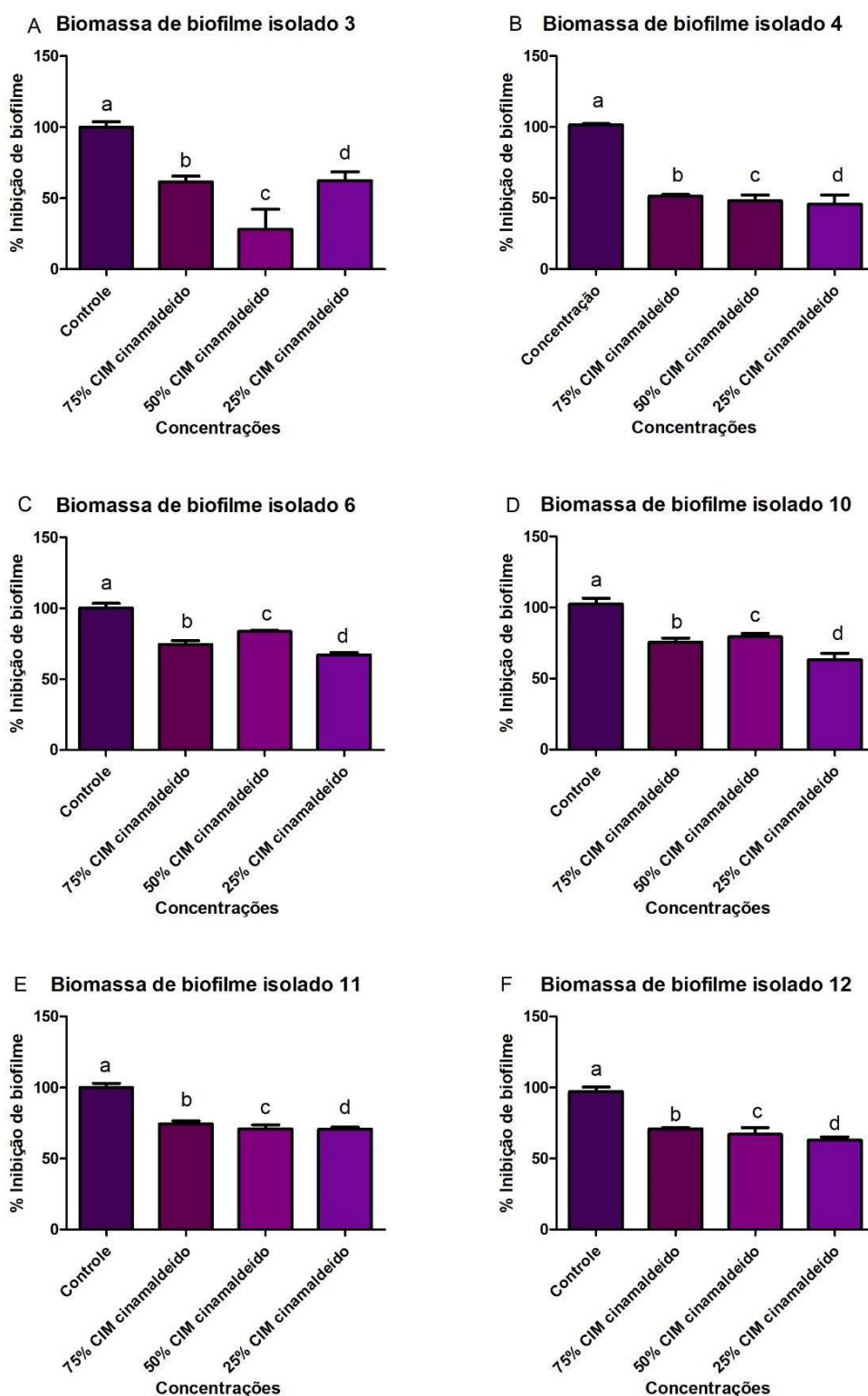


Figura 5. Inibição da formação de biomassa de biofilme por cinamaldeído para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12. Inibição da produção de biomassa de biofilme por cinamaldeído para o isolado 3 (A), isolado 4 (B), isolado 6 (C), isolado 10 (D), isolado 11 (E) e isolado 12 (F).

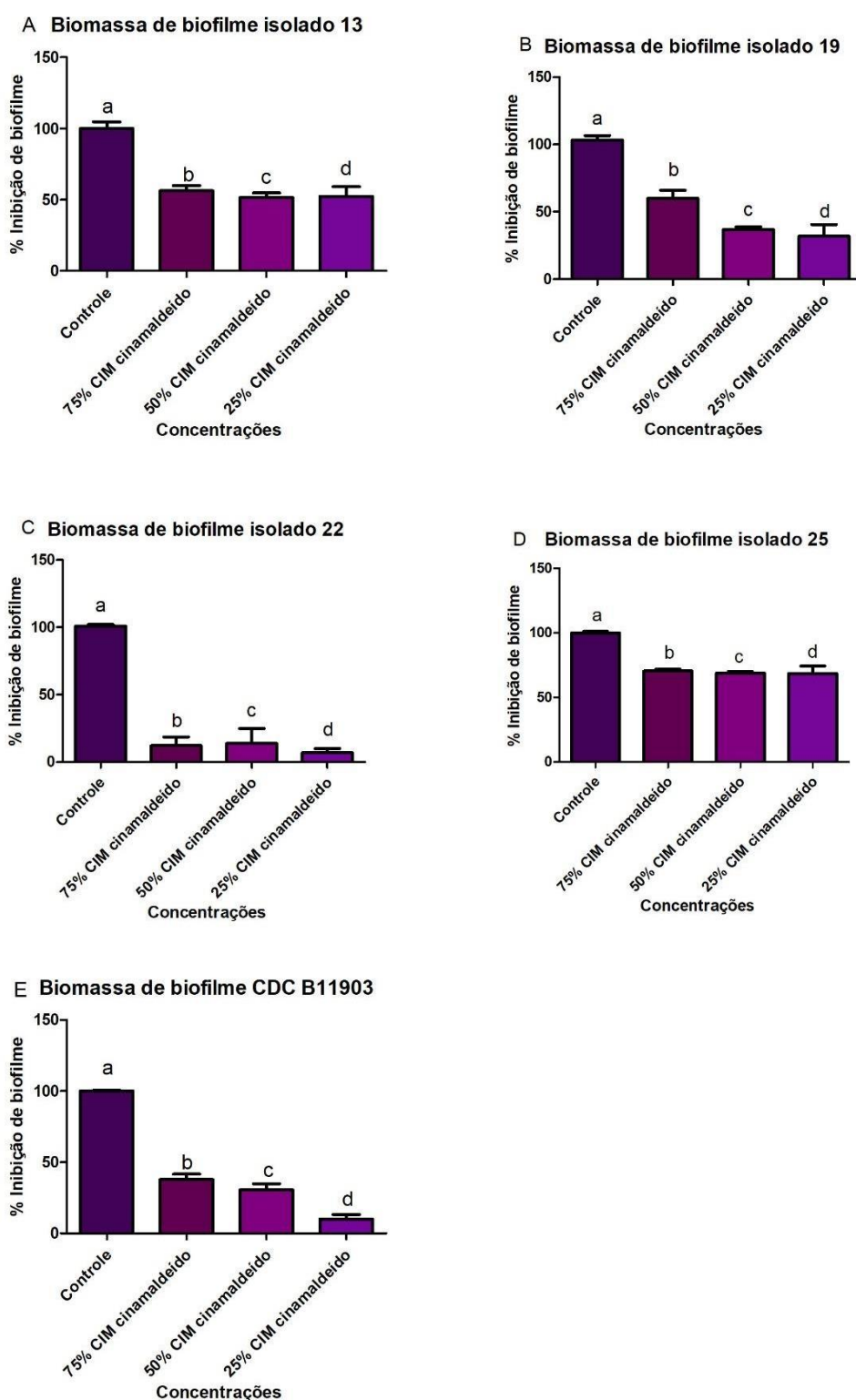


Figura 6. Inibição da formação de biomassa de biofilme por cinamaldeído para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903. Inibição da produção de biomassa de biofilme por cinamaldeído para o isolado 13 (A), isolado 19 (B), isolado 22 (C), isolado 25 (D) e CDC B11903 (E).

4.3.4 Ação de eugenol e cinamaldeído na atividade metabólica de biofilme

As mesmas 11 amostras estudadas em relação a biomassa, também foram testadas para verificar a ação dos produtos naturais sobre a atividade metabólica do biofilme.

As figuras 7 e 8 são apresentados gráficos com a atividade metabólica de biofilme quando os isolados foram tratados com eugenol. Foi observado um aumento de 5% na atividade metabólica de biofilme no isolado 3 (Fig. 7a) quando tratado com 75% da CIM de eugenol. Ocorreu um aumento de 18% e uma redução de 4% quando os biofilmes foram tratados com 50% e 25% da CIM. Para o isolado 4 (Fig. 7b) foi observado um aumento de 141% da atividade metabólica em relação ao controle quando o biofilme foi tratado com 75% da CIM de eugenol. Quando os biofilmes foram tratados com 50% e 25% da CIM, ocorreu um aumento de atividade metabólica de 114% e 100%, respectivamente. Observou-se uma elevação na atividade metabólica de 82%, 107% e 75% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 6 (Fig. 7c) foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol. Houve um aumento de atividade metabólica de cerca de 20% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 10 (Fig. 7d) foram tratados com 75% e 50% da CIM, enquanto o aumento foi de 29% quando tratado com 25% da CIM. Para o isolado 11 (Fig. 7e) foi observado um aumento de atividade metabólica de 3% e 10% quando os biofilmes foram tratados com 75% e 50% da CIM de eugenol, e uma redução de 4% quando tratado com 25% da CIM. O aumento da atividade metabólica foi de 116%, 132% e 137% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 12 (Fig. 7f) foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol.

Para o isolado 13 (Fig. 8a) foi observado um aumento de atividade metabólica de 22%, 50% e 33% quando os biofilmes foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol. Houve uma redução de atividade metabólica de biofilme para o isolado 19 (Fig. 8b) de 17% e 28% quando tratados com 75% e 25% da CIM de eugenol, e um aumento de 18% com tratamento com 50% da CIM. Foi observada uma redução de atividade metabólica de 47%, 45% e 42% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 22 (Fig. 8c) foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol. Foi observada uma redução de atividade metabólica de 32%, 19% e 57% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 25 (Fig. 8d) foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol. Houve uma redução de atividade metabólica de 12%, 8% e 14% nos biofilmes produzidos pela cepa CDC B11903 quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de eugenol.

Nas figuras 9 e 10 são apresentados gráficos com a atividade metabólica de biofilme quando os isolados foram tratados com cinamaldeído. Foi observado um aumento de atividade metabólica de 11%, 3% e 13% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 3 (Fig. 9a) foram

tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído. Houve um aumento de atividade metabólica de 97%, 92% e 95% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 4 (Fig. 9b) foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído. O aumento da atividade metabólica dos biofilmes produzidos pelo isolado 6 (Fig. 9c) foi de 85% quando tratados com 75% e 50% da CIM e de 80% quando tratado com 25% da CIM de cinamaldeído. Foi observado um aumento de 8% da atividade metabólica quando o biofilme produzido pelo isolado 10 (Fig. 9d) foi tratado com 75% da CIM de cinamaldeído, e uma redução de 4% e 12% quando os biofilmes foram tratados com 50% e 25% da CIM, respectivamente. Houve um aumento de 3% na atividade metabólica quando o biofilme produzido pelo isolado 11 (Fig. 9e) foi tratado com 75% da CIM de cinamaldeído, e uma redução de 4% e 6% quando foram tratados com 50% e 25% da CIM, respectivamente. Foi observado um aumento de atividade metabólica de 70%, 53% e 81% nos biofilmes produzidos pelo isolado 12 (Fig. 9f) quando tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído, respectivamente.

Foi observada uma redução de 4% na atividade metabólica de biofilme no isolado 13 (Fig. 10a) quando tratado com 75% da CIM de cinamaldeído e um aumento de 0,8% e 3% quando os biofilmes foram tratados com 50% e 25% da CIM, respectivamente. Para o isolado 19 (Fig. 10b), foi observada uma redução de atividade metabólica de 4%, 12% e 9% quando os biofilmes foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído. Uma redução de 40%, 30% e 27% foi observada quando o isolado 22 (Fig. 10c) foi tratado com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído, respectivamente. A redução foi de 27%, 30% e 22% quando os biofilmes produzidos pelo isolado 25 (Fig. 10d) foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído. Foi observada uma redução de atividade metabólica de 12%, 4% e 10% quando os biofilmes produzidos pela cepa CDC B11903 foram tratados com 75%, 50% e 25% da CIM de cinamaldeído.

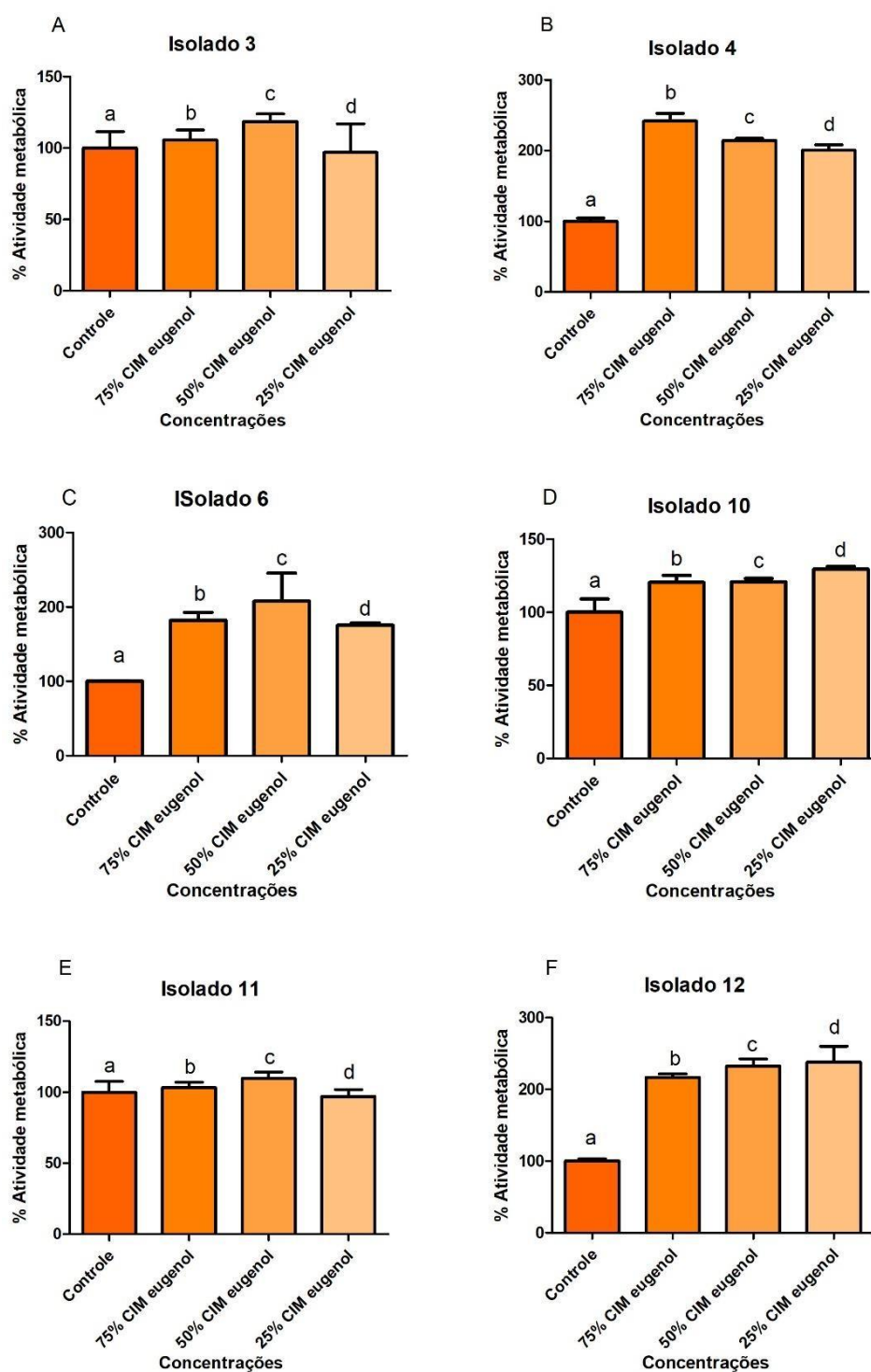


Figura 7. Atividade metabólica de biofilme por eugenol para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12. Porcentagem de atividade metabólica de biofilme por eugenol para o isolado 3 (A), isolado 4 (B), isolado 6 (C), isolado 10 (D), isolado 11 (E) e isolado 12 (F).

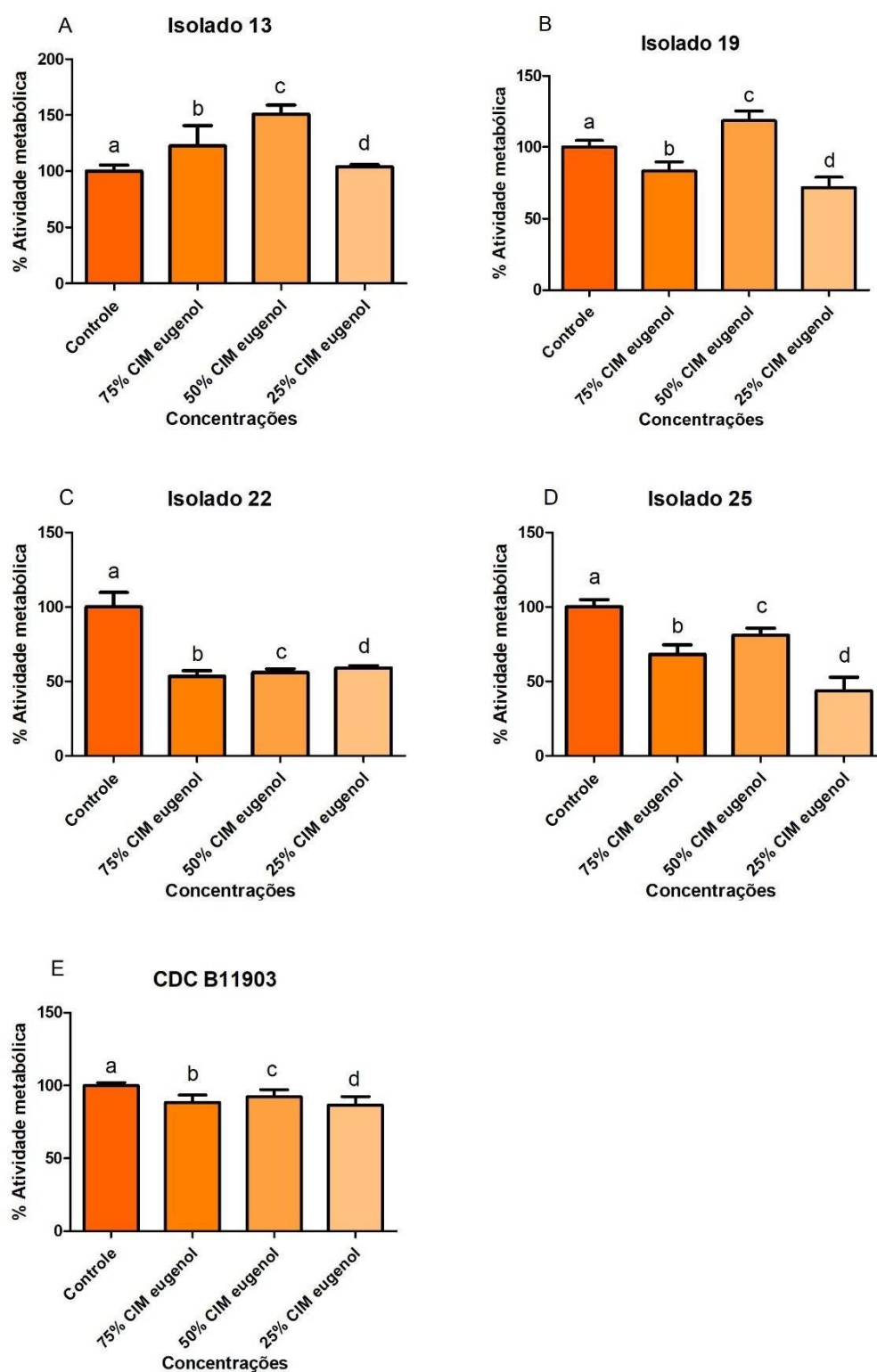


Figura 8. Atividade metabólica de biofilme por eugenol para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903. Porcentagem de atividade metabólica de biofilme por eugenol para o isolado 13 (A), isolado 19 (B), isolado 22 (C), isolado 25 (D) e CDC B11903 (E).

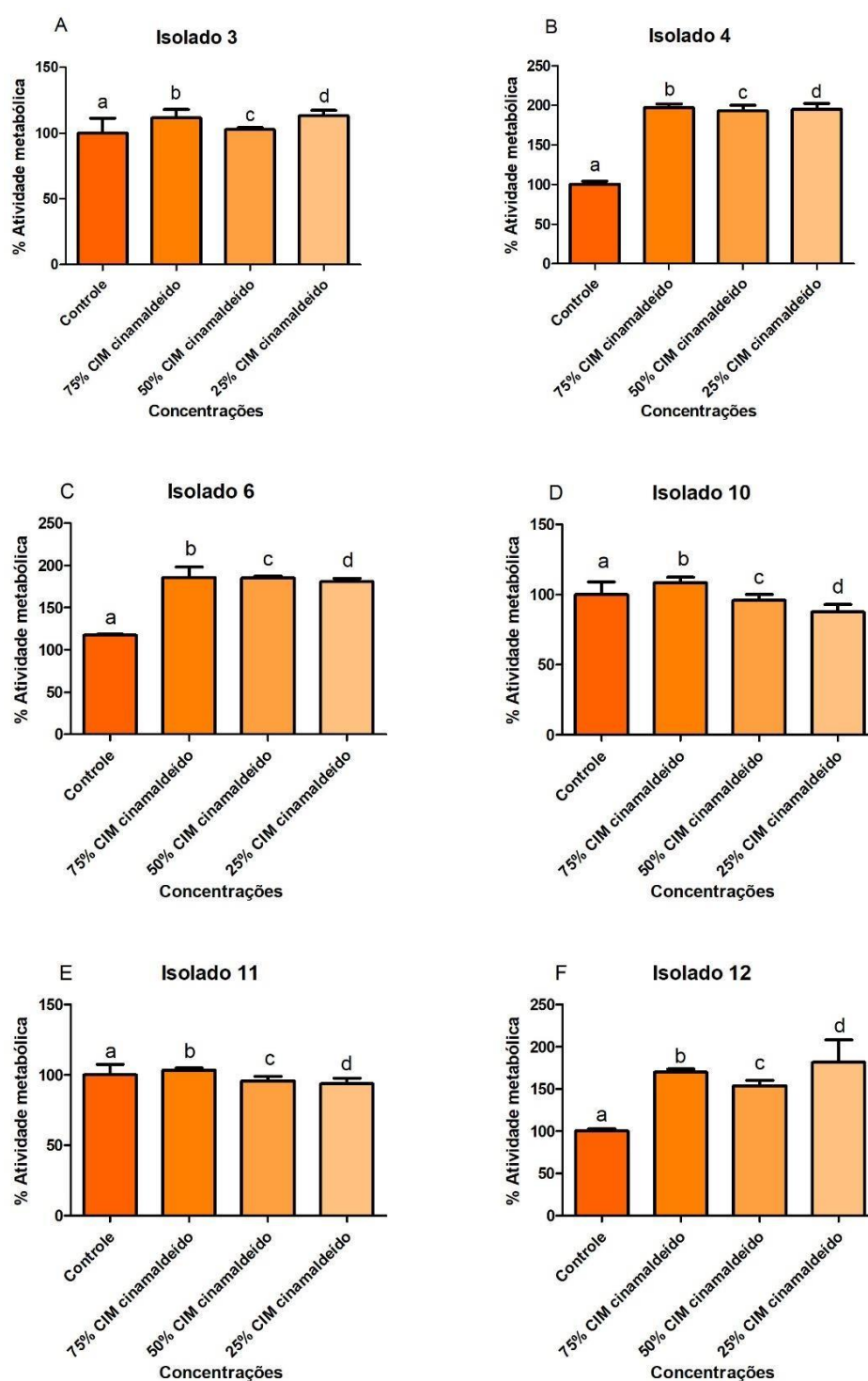


Figura 9. Atividade metabólica de biofilme por cinamaldeído para os isolados 3, 4, 6, 10, 11 e 12. Porcentagem de atividade metabólica de biofilme por cinamaldeído para o isolado 3 (A), isolado 4 (B), isolado 5 (C), isolado 10 (D), isolado 11 (E) e isolado 12 (F).

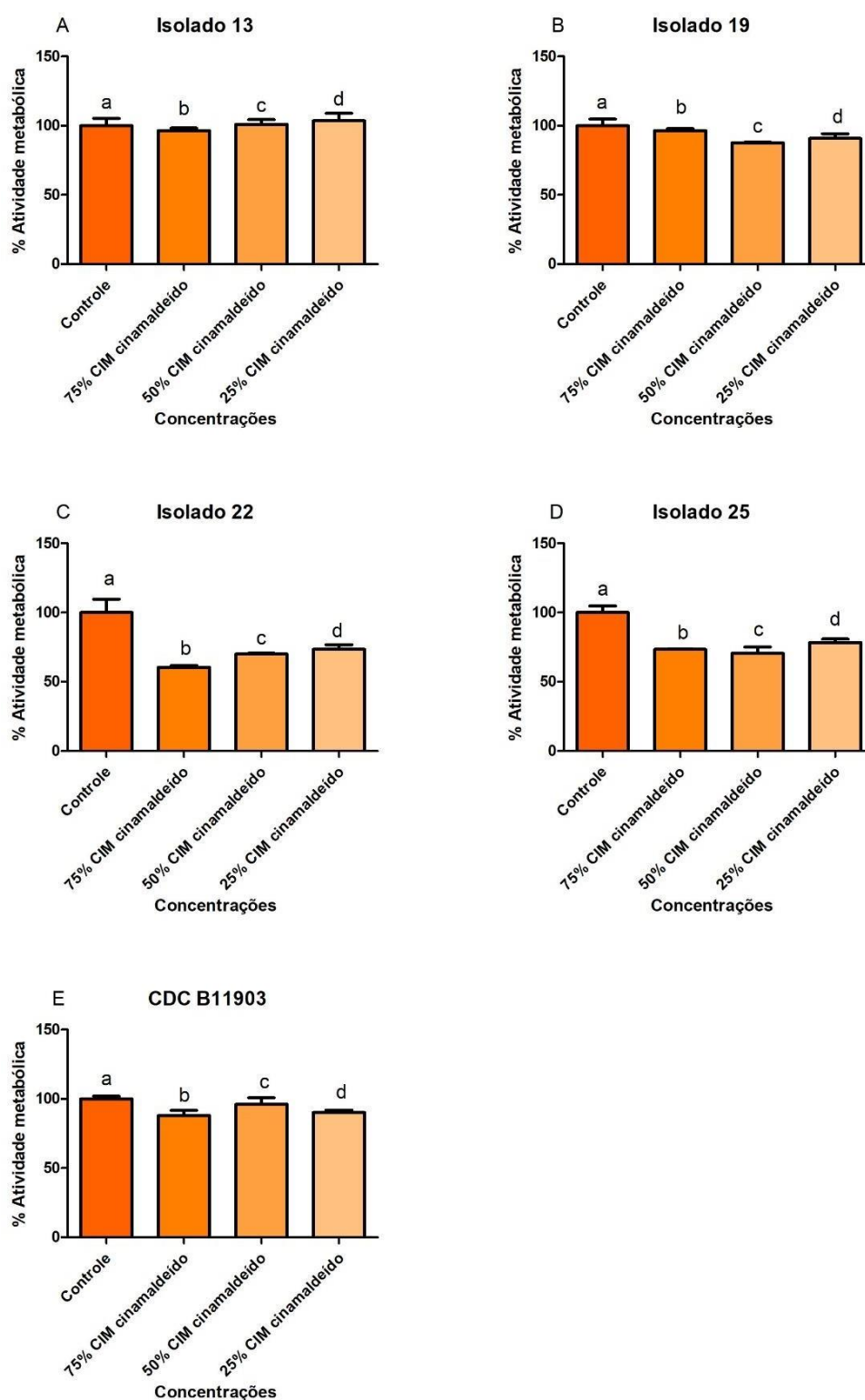


Figura 10. Atividade metabólica de biofilme por cinnamaldeído para os isolados 13, 19, 22, 25 e CDC B11903. Porcentagem de atividade metabólica de biofilme por cinnamaldeído para o isolado 13 (A), isolado 19 (B), isolado 22 (C), isolado 25 (D) e CDC B11903 (E).

4.4 Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade em células Vero mostrou que, na concentração de 500 µg/ml do eugenol, a viabilidade celular foi de 5,74%. Na concentração de 250 µg/ml, a viabilidade foi de 65,6%. Nas concentrações de 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µg/ml, a viabilidade foi de 70%, 52%, 81,97%, 109% e 119%, respectivamente, indicando que nas duas concentrações mais baixas ocorreu proliferação celular (Figura 11). Os resultados foram estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

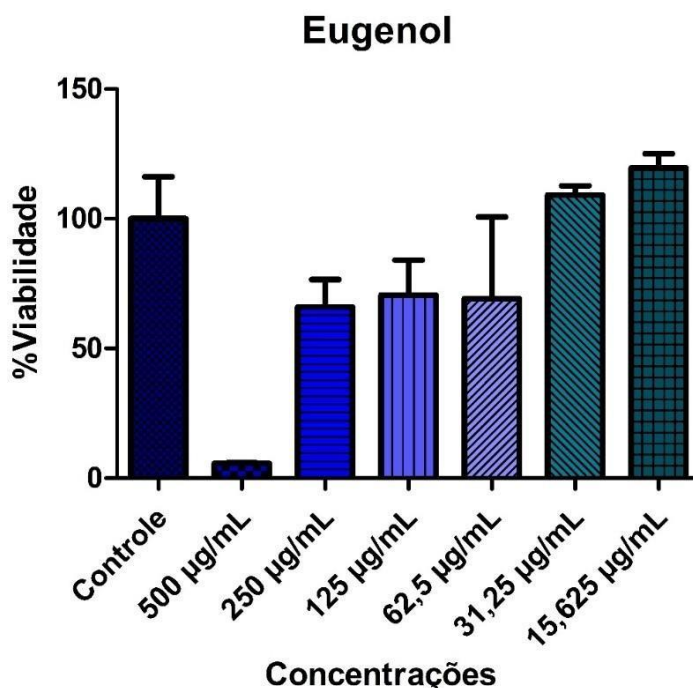


Figura 11. Viabilidade celular de células Vero após 48 horas de tratamento com eugenol. Porcentagem de viabilidade celular de células Vero após 48 horas de tratamento com eugenol em concentrações variando entre 15,625 e 500 µg/ml. Houve significância estatística quando $p < 0,05$.

No tratamento de células Vero com cinamaldeído em concentrações, a viabilidade celular foi de cerca de 4,5% após os tratamentos nas concentrações de 500, 250, 125 e 62,5 µg/ml. Na concentração de 31,25 µg/ml, a viabilidade celular foi de 33,45% e na concentração de 15,625 µg/ml, a viabilidade celular foi de 94,42% (Figura 12). Os resultados foram estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

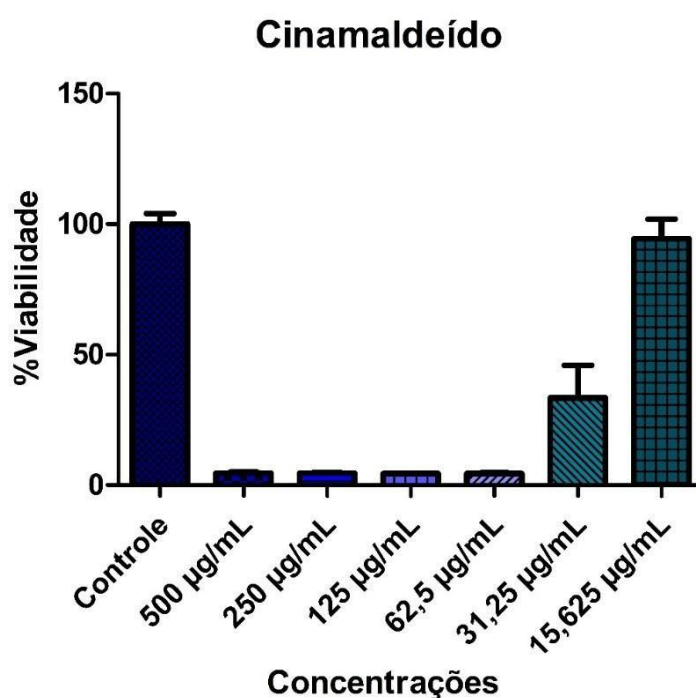


Figura 12. Viabilidade celular de células Vero após 48 horas de tratamento com cinamaldeído. Porcentagem da viabilidade celular de células Vero após 48 horas de tratamento com cinamaldeído em concentrações variando entre 15,625 e 500 µg/ml. Houve significância estatística quando $p < 0,05$.

4.5 ANÁLISE PROTEÔMICA

4.5.1 Quantificação proteica

Os ensaios de quantificação proteica evidenciaram a equação da reta por meio da curva de calibração frente à diferentes diluições da proteína comercial albumina (Tabela 7 e Figura 13).

Tabela 7. Obtenção dos dados de absorbância frente à diferentes diluições (massa) da proteína comercial albumina para obtenção da equação da reta junto ao método de Bradford.

Massa proteína (µg)	Média das absorbâncias (595 nm)
Branco	0
1 µg	0,207
2 µg	0,345
4 µg	0,606
6 µg	0,817

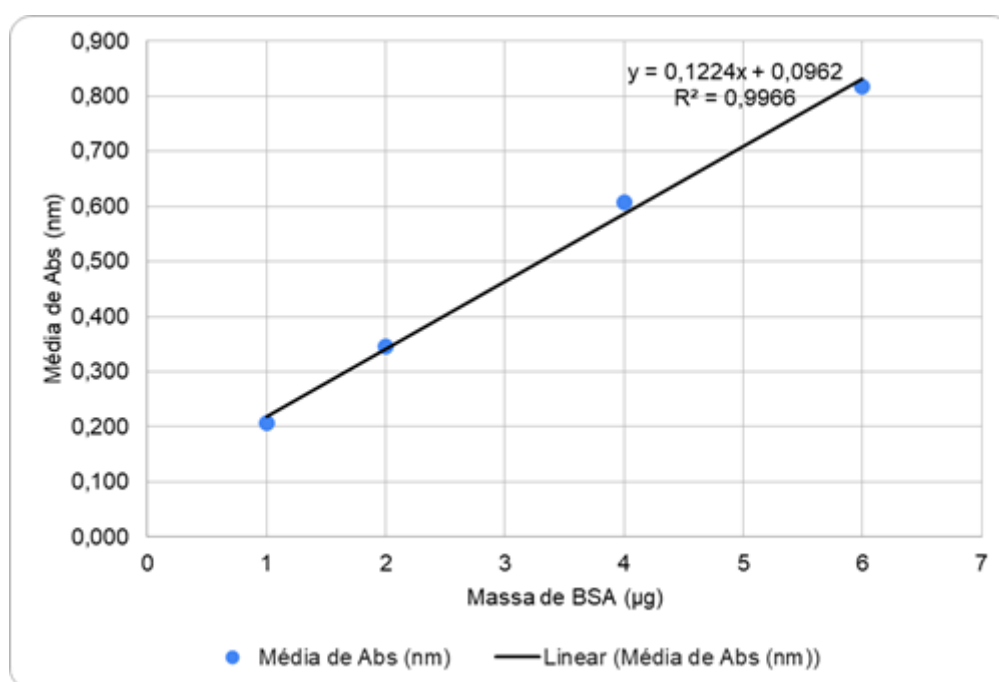


Figura 13. Elaboração da curva de calibração do método de Bradford, utilizando como proteína padrão comercial albumina bovina. Quatro diluições da proteína padrão foram ensaiadas para aquisição da equação da reta.

A partir da elaboração da curva de calibração utilizando a proteína comercial albumina, obteve-se a equação da reta mediante $R^2 = 0,9966$ (Figura 13), equação utilizada para correlacionar as absorbâncias das amostras desconhecidas à massa de proteína em microgramas de cada amostra. Assim, determinou-se a concentração de proteínas nas amostras conforme a Tabela 8, evidenciando a quantidade total de proteínas em cada amostra.

Tabela 8. Concentração de proteínas nas amostras obtidas pelo método de Bradford.

Identificação da amostra (tratamentos)	Concentração $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$	Massa total de proteínas (μg)
Controle	3,43	206,04
Itraconazol	1,19	17,78
Cinamaldeído	2,12	190,81
Eugenol	2,56	243,12
Eugenol + Itraconazol	1,83	31,19
Cinamaldeído + Itraconazol	0,25	12,40

Ensaio de eletroforese unidimensional para avaliar o perfil proteico e eventuais efeitos de degradação não foram realizados devido à baixa quantidade de proteínas totais em várias amostras. Assim, a etapa de digestão proteica foi realizada dando continuidade no processamento das amostras para as análises proteômicas.

4.5.2 Proteínas expressas

Foram identificadas 184 proteínas no grupo controle e 137 no tratamento com itraconazol, com 221 proteínas em comum (Figura 14). As proteínas comuns diferencialmente expressas também são representadas no diagrama de Volcano Plot (Figura 15). Na figura 16, observa-se as interações entre proteínas evidenciando os principais processos biológicos envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas no grupo controle e grupo tratado com itraconazol. Os processos metabólicos, ribossomos encontrados no citosol, biossíntese de compostos nitrogenados e síntese proteica foram os processos com maior quantidade de genes/proteínas envolvidas nos grupos analisados. Na tabela 9, observa-se a quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e itraconazol.

Dentre as proteínas comuns menos expressas no controle em relação ao tratamento com itraconazol foram encontradas proteínas relacionadas à montagem de complexos proteicos no retículo endoplasmático, atividade catalítica, composição ribossomal, ATPase de membrana plasmática, composição de nucleossomos, produção de ATP, atividade catalítica de ATP em ADP na membrana plasmática, proteínas de membrana mitocondrial, metabolismo de

carboidratos, controle do ciclo do ácido cítrico, homeostase de lipídeos, componentes estruturais de cromatina, hidrólise de peptídeos, fatores de elongação e atividade oxidante. A enzima catalase, responsável pela proteção do organismo dos efeitos tóxicos do peróxido de hidrogênio também foi regulada negativamente. A enzima superóxido dismutase, responsável pela eliminação de radicais tóxicos para organismos foi regulada negativamente. Proteínas importantes para a síntese e manutenção de parede celular como 1,3-beta-glucanosyltransferase e glucana 1,3-beta-glucosidase, também apresentaram uma regulação negativa no controle em relação à amostra tratada com itraconazol.

Dentre as proteínas mais expressas no controle em relação ao itraconazol, destacam-se a álcool desidrogenase, enzimas responsáveis pela degradação de carboidratos, enzimas responsáveis pelo metabolismo energético, metabolismo de catecolaminas, proteínas de choque térmico (responsáveis por manter a homeostase proteica), síntese de cisteína, biossíntese de aminoácidos, fator de sobrevivência em condições de estresse oxidativo, biossíntese de aminoácidos, biossíntese de carboidratos e nucleotídeos, estabilização de microtúbulos, proteínas relacionadas à homeostase da membrana plasmática, clivagem de aminoácidos, proteínas relacionadas ao metabolismo energético e proteínas envolvidas com a liberação de vesículas pelo aparelho de Golgi.

Nas proteínas expressas exclusivamente no controle, destacam-se às relacionadas ao metabolismo de enxofre, biossíntese de riboflavina, síntese de espermidina, metabolismo de pirimidina, relacionadas ao tRNA, metabolismo de carboidratos, biossíntese de aminoácidos, metabolismo energético, proteínas mitocondriais, formação de tubulina, componentes celulares de núcleo e citosol, hidrólise de ATP, biossíntese de polissacarídeos, metabolismo de vitamina B₆, regulação de proteínas através de fosforilação, proteínas de parede celular, metabolismo de inositol, metabolismo de metionina, metabolismo de proteínas, síntese de sulfato, homeostase intracelular, componentes de membrana celular, componentes de núcleo e citosol, montagem dos filamentos de actina, organização dos microtúbulos, biossíntese de esteróides e componentes de membrana.

Dentre as proteínas exclusivamente expressas na amostra tratada com itraconazol, destacam-se as relacionadas à resposta à estímulo, divisão celular, metabolismo de esteróides, transportador do tipo ABC (Figura 17), ribossomos e processos relacionados à síntese proteica, síntese de parede celular, componentes de membrana celular, biossíntese de ferro, biossíntese de esteróides, replicação de DNA, síntese de glicogênio, proteína de membrana relacionada à multirresistência, biossíntese de ácidos graxos e aminoácidos, proteínas de choque térmico, biossíntese de ergosterol e proteína de estresse DDR48.

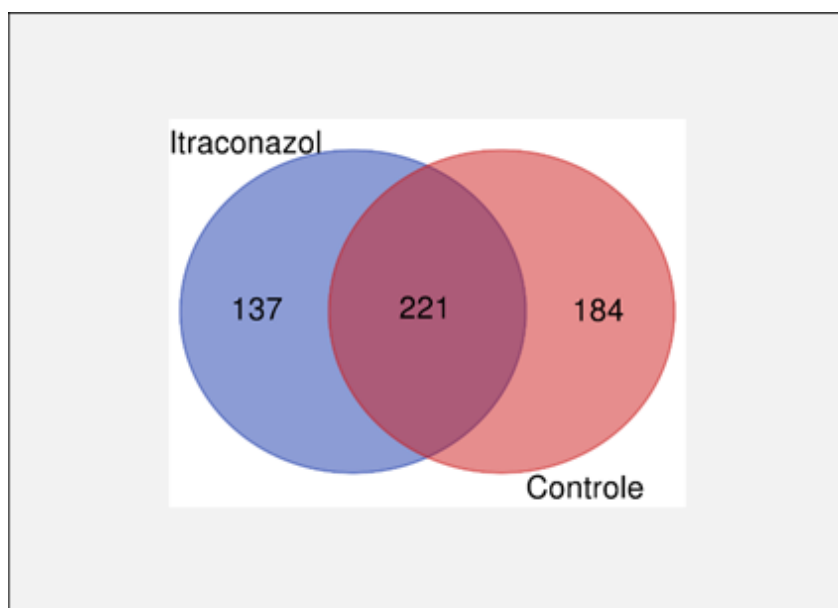


Figura 14. Diagrama de Venn evidenciando 221 proteínas comuns entre os grupos Controle e Itraconazol e as proteínas identificadas apenas em um dos grupos, onde 137 proteínas foram identificadas como exclusivas do grupo Itraconazol e 184 proteínas identificadas como exclusiva do grupo Controle.

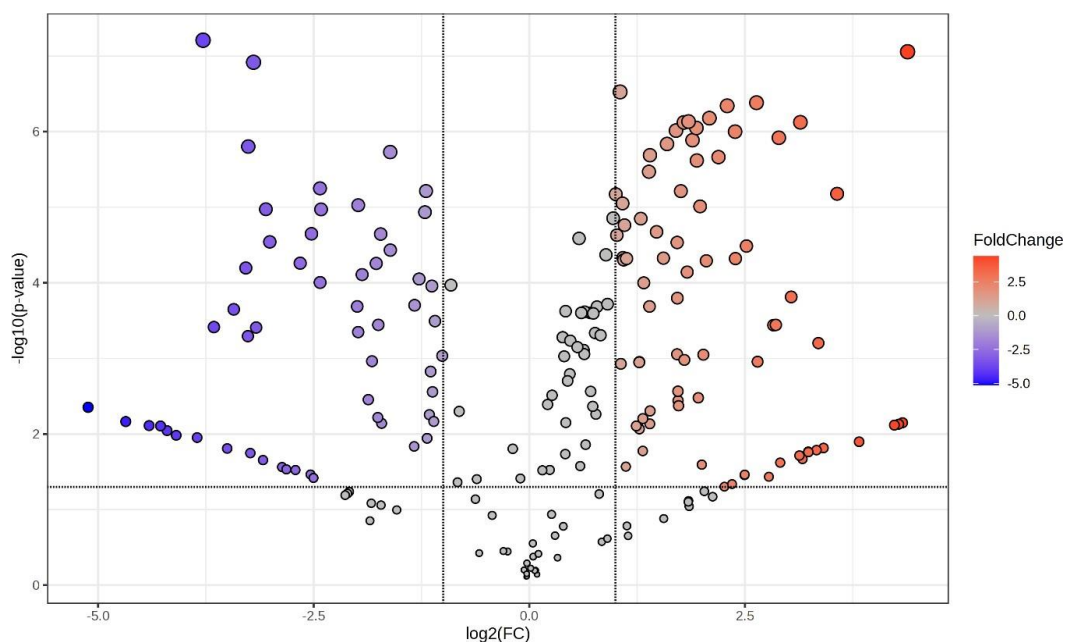


Figura 15. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Itraconazol. Direção da comparação = Controle/Itraconazol. Down - proteínas menos expressas no Controle em relação ao Itraconazol

e Up - proteínas mais expressas no Controle em relação ao Itraconazol. Proteínas menos expressas (pontos azuis) e proteínas mais expressas (pontos vermelhos). Parâmetros utilizados $p \leq 0,05$ e fold change ≥ 2 .

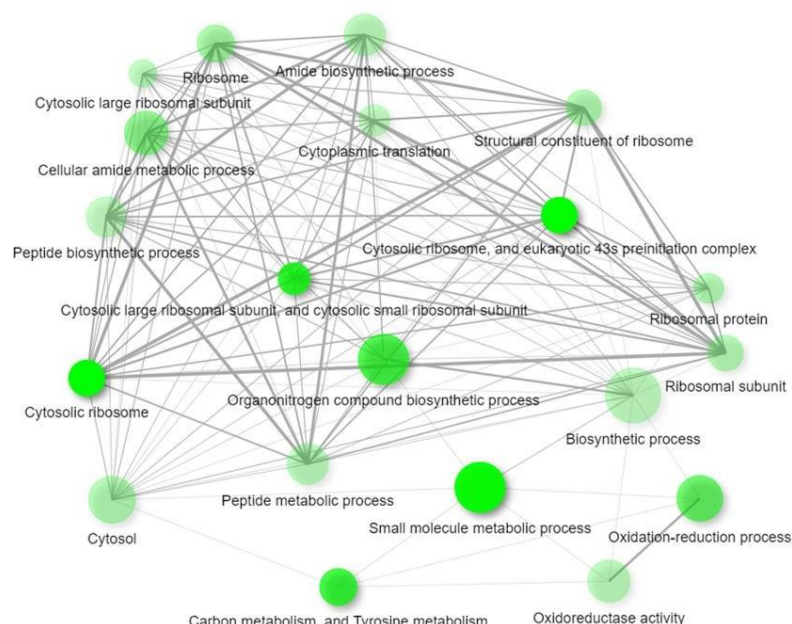


Figura 16. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Itraconazol. Os círculos maiores destacam uma frequência maior de proteínas envolvidas no processo e as linhas que ligam os círculos, quando mais espessas, indicam uma maior interação entre os processos que estão conectados. Análise processada pela ferramenta ShinyGO.

Tabela 9. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com itraconazol.

Nº de genes	Processos biológicos
188	Processos biossintéticos
145	Processos metabólicos de pequenas moléculas
144	Biossíntese de compostos nitrogenados
116	Citosol
109	Processos de oxidação-redução
95	Processos metabólicos de amidas
88	Atividade oxiredutase
82	Biossíntese de amidas
80	Metabolismo de peptídeos
75	Biossíntese de peptídeos
62	Metabolismo de carbono e tirosina
61	Ribossomos
58	Ribossomos citosólicos
57	Ribossomos citosólicos e complexo de iniciação de síntese proteica
56	Subunidades ribossomais
55	Constituintes estruturais de ribossomos
43	Subunidades maiores e menores de ribossomos
40	Processo de tradução
36	Proteínas ribossomais
30	Subunidade maior de ribossomos citosólicos

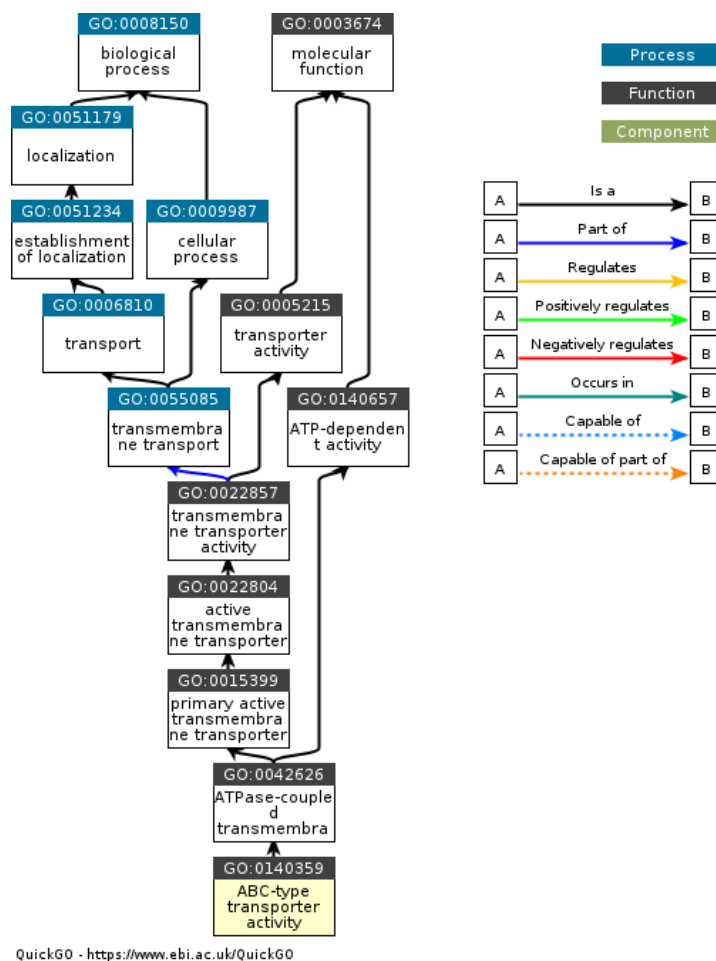


Figura 17. Proteína expressa exclusivamente na amostra tratada com itraconazol, evidenciando a presença de transportadores do tipo ABC (bomba de efluxo).

Na amostra tratada com eugenol, foram encontradas 128 proteínas expressas exclusivamente no controle, 31 expressas exclusivamente no tratamento com eugenol e 277 proteínas em comum (Figura 18). As proteínas comuns diferencialmente expressas também são representadas no diagrama de Volcano Plot (Figura 19). Na figura 20, observa-se as interações entre proteínas evidenciando os principais processos biológicos envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas no grupo controle e grupo tratado com eugenol. Processos metabólicos de pequenas moléculas e biossíntese de compostos nitrogenados são os processos com maior quantidade de genes/proteínas envolvidos. Na tabela 10, observa-se a quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e eugenol.

Dentre as proteínas comuns menos expressas no controle em relação ao tratamento com eugenol, destacam-se as relacionadas à homeostase de lipídeos, metabolismo de superóxidos, proteínas estruturais de ribossomos e relacionadas à síntese de proteínas, componente de

membrana celular, transporte de ATP trans-membrana, parede celular, metabolismo de carboidratos, ligação de íons metálicos, estabilidade de mRNA, estabilização de proteínas, organização de parede celular, regulação da RNA polimerase, componentes estruturais de citosol, núcleo e mitocôndria, biossíntese de beta-glucana, degradação de aminoácidos, formação de actina, transporte de proteínas, componentes de membrana mitocondrial e proteínas com atividade catalítica.

Destacam-se dentre as proteínas mais expressas no controle em relação ao tratamento com eugenol às relacionadas ao crescimento celular, proteólise, catálise de aminoácidos, regulação da síntese de proteínas constituintes estruturais de ribossomos, formação de ácidos nucleicos, homeostase, processos catabólicos, regulação negativa de formação de hifas, componentes de vacúolos e de aparelho de Golgi, biossíntese de esteróides, biossíntese de compostos nitrogenados, componente de telômeros e metabolismo de carboidratos.

Dentre as proteínas expressas exclusivamente no controle, destacam-se as relacionadas à síntese de riboflavina, metabolismo de carboidratos, metabolismo energético, transporte de vesículas, constituintes do citoesqueleto, componentes de citosol e mitocôndrias, hidrólise de ATP, fosforilação, biossíntese de tiamina, componentes de parede celular, biossíntese de bases nitrogenadas, síntese proteica, componentes de membrana celular, síntese de lipídeos e alongamento das cadeias de 1,3-beta-glucano na parede celular.

Nas proteínas expressas exclusivamente na amostra tratada com o eugenol, destacam-se as relacionadas com estrutura ribossomal, componentes de núcleo e citoplasma, metabolismo energético, metabolismo de carboidratos, filamento de actina, formação de precursores importantes para a síntese de parede celular, transporte intracelular e síntese de material genético.

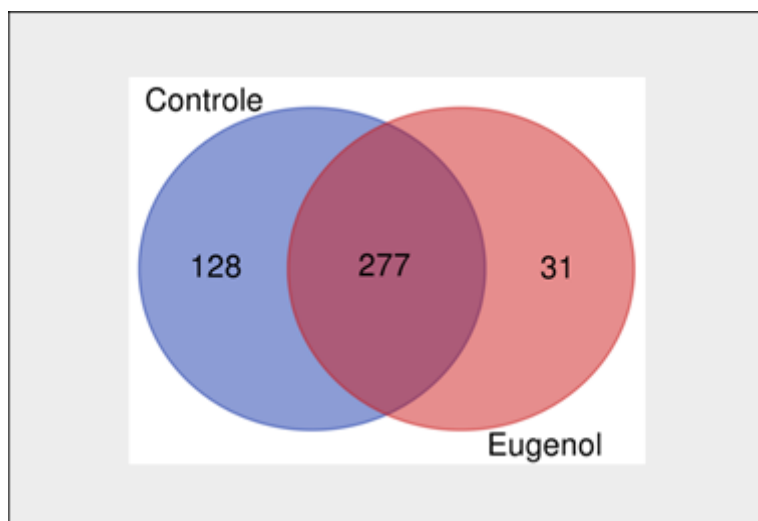


Figura 18. Diagrama de Venn evidenciando 277 proteínas comuns entre os grupos Controle e Eugenol e as proteínas identificadas apenas em um dos grupos, onde 31 proteínas foram identificadas como exclusivas do grupo Eugenol e 128 proteínas identificadas como exclusiva do grupo Controle.

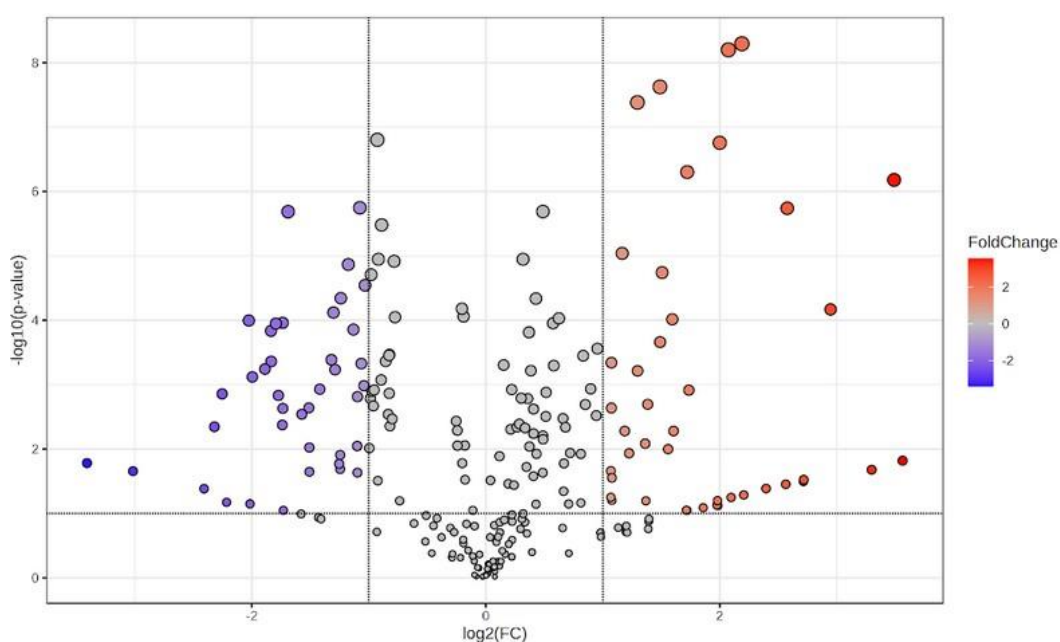


Figura 19. Diagrama de Volcano Plot, representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Eugenol. Direção da comparação = Controle/Eugenol. Down - proteínas menos expressas no Controle em relação ao Eugenol e Up - proteínas mais expressas no Controle em relação ao Eugenol. Proteínas menos expressas (pontos azuis) e proteínas mais expressas (pontos vermelhos). Parâmetros utilizados $p \leq 0,05$ e fold change ≥ 2 .

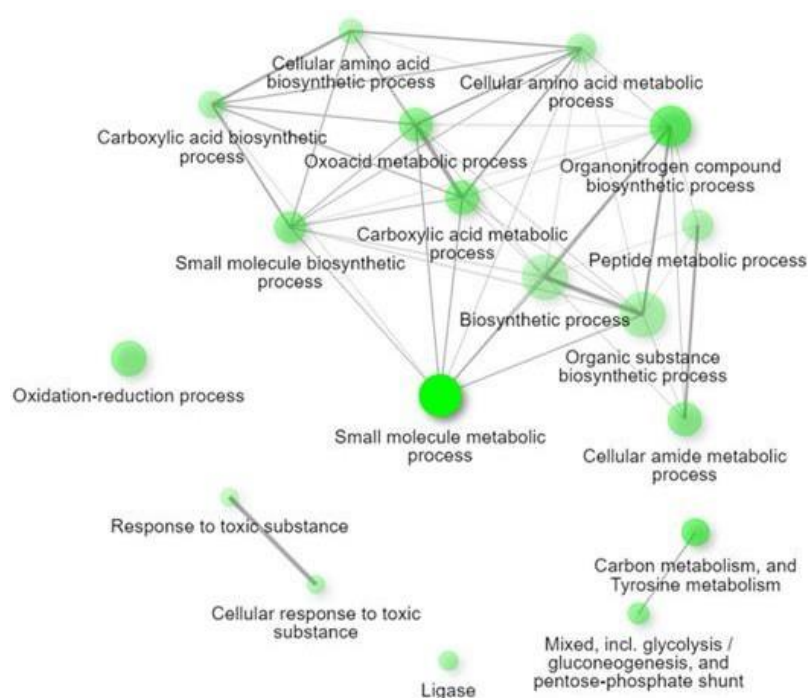


Figura 20. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Eugenol. Os círculos maiores destacam uma frequência maior de proteínas envolvidas no processo e as linhas que ligam os círculos, quando mais espessas, indicam uma maior interação entre os processos que estão conectados. Análise processada pela ferramenta ShinyGO.

Tabela 10. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com eugenol.

Nº de genes	Processos biológicos
7	Resposta celular à substâncias tóxicas
8	DNA ligase
7	Resposta a substâncias tóxicas
10	Glicólise e gliconeogênese
17	Metabolismo de carbono e tirosina
13	Biossíntese de aminoácidos
16	Biossíntese de ácido carboxílico
23	Biossíntese de pequenas moléculas
19	Metabolismo de aminoácidos
47	Metabolismo de pequenas moléculas
27	Metabolismo de ácido carboxílico
27	Metabolismo de oxoácidos
22	Metabolismo de peptídeos
27	Metabolismo de amidas
30	Processos de oxi-redução
43	Biossíntese de compostos nitrogenados
56	Biossíntese de substâncias orgânicas
56	Processos biossintéticos

Na amostra tratada com cinamaldeído foram encontradas 187 proteínas expressas exclusivamente no controle, 22 expressas exclusivamente no cinamaldeído e 218 em comum (Figura 21). As proteínas comuns diferencialmente expressas são representadas no diagrama de Volcano Plot (Figura 22). Na figura 23, observa-se as interações entre proteínas evidenciando os principais processos biológicos envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas no grupo controle e grupo tratado com cinamaldeído. Processos metabólicos de pequenas moléculas, processos de oxirredução e atividade oxirredutase são os processos com maior quantidade de genes/proteínas envolvidos. Na tabela 11, observa-se a quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e cinamaldeído.

Dentre as proteínas menos expressas no controle em relação a amostra tratada com cinamaldeído, destacam-se as relacionadas à síntese de proteínas, componentes estruturais do citoplasma, atividade oxirredutase, transporte de prótons através da membrana celular, ligação de ATP, organização de vesículas, regulação da produção de actina, componentes estruturais de ribossomos e assimilação de sulfato.

Na amostra tratada com cinamaldeído, dentre as proteínas mais expressas em relação ao controle, destacam-se as relacionadas aos processos metabólicos de compostos fosfatados,

atividade de GTPase, proteólise, componentes estruturais de vacúolos, catabolismo de triptofano, biossíntese de poliaminas, biossíntese de esteróides, componentes estruturais do citosol, metabolismo de triglicerídeos, metabolismo de carboidratos, matriz mitocondrial, atividade antioxidante, componentes estruturais do retículo endoplasmático, componentes estruturais de membranas, regulação negativa de filamentação, metilação, transporte de RNA e biossíntese de ergosterol.

Dentre as proteínas exclusivamente expressas no controle, destacam-se as relacionadas à atividade de acetil-CoA, componentes estruturais de citoplasma, metilação, proteólise, atividade de aminopeptidase, ligação de ATP, fosforilação, replicação do DNA, constituintes do citoesqueleto, biossíntese e metabolismo de cisteína, componentes estruturais de núcleo, síntese de subunidade maior de ribossomos, biossíntese de tiamina, componentes de parede celular, regulação de RNA polimerase, estabilidade da síntese de proteínas, eliminação de peróxido de hidrogênio, homeostase, componentes de membrana, aparelho de Golgi, oxidação de etanol, catálise de ribose, estrutura de cromatina, biossíntese de esteróides, componentes estruturais de membrana celular, formação de actina e funções estruturais de citoesqueleto. Componentes estruturais de ribossomos e biossíntese de parede celular.

Na amostra tratada com cinamaldeído, destacaram-se as proteínas relacionadas à síntese de proteínas, resgate de metionina, fosforilação, metabolismo de carboidratos e catálise de glicogênio.

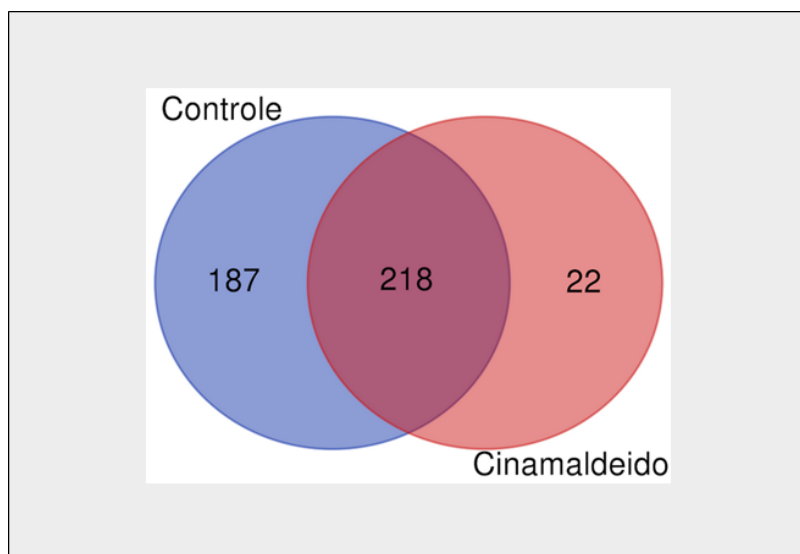


Figura 21. Diagrama de Venn evidenciando 218 proteínas comuns entre os grupos Controle e Cinamaldeído e as proteínas identificadas apenas em um dos grupos, onde 22 proteínas foram identificadas como exclusivas do grupo Cinamaldeído e 187 proteínas identificadas como exclusiva do grupo Controle.

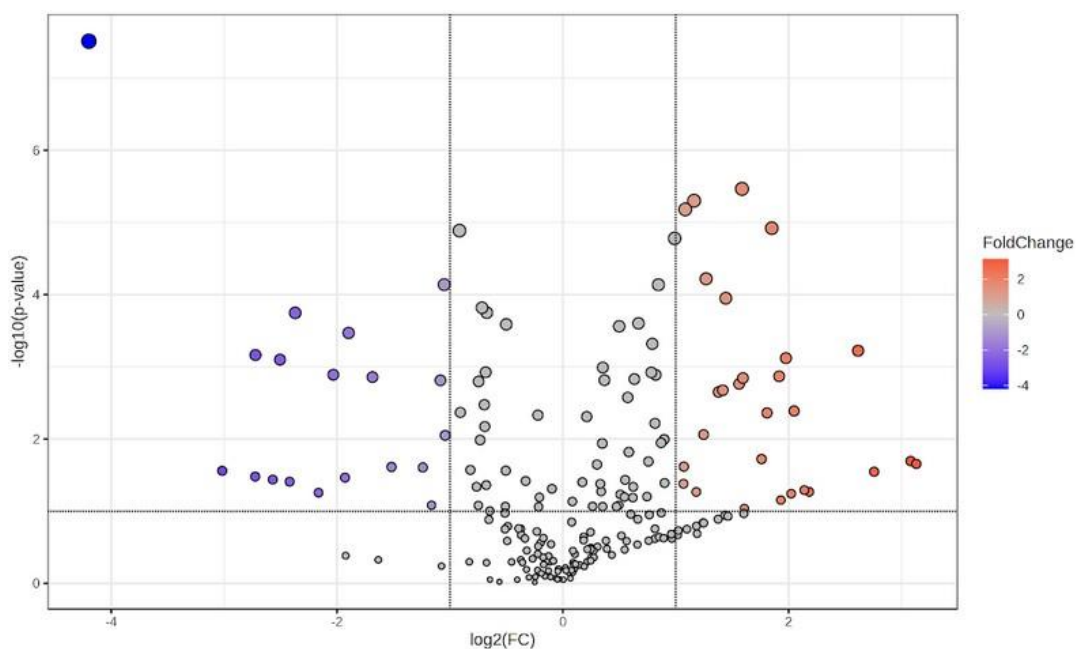


Figura 22. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Cinamaldeído. Direção da comparação = Controle/Cinamaldeído. Down - proteínas menos expressas no Controle em relação ao Cinamaldeído e Up - proteínas mais expressas no Controle em relação ao Cinamaldeído.

Proteínas menos expressas (pontos azuis) e proteínas mais expressas (pontos vermelhos). Parâmetros utilizados $p \leq 0,05$ e fold change ≥ 2 .

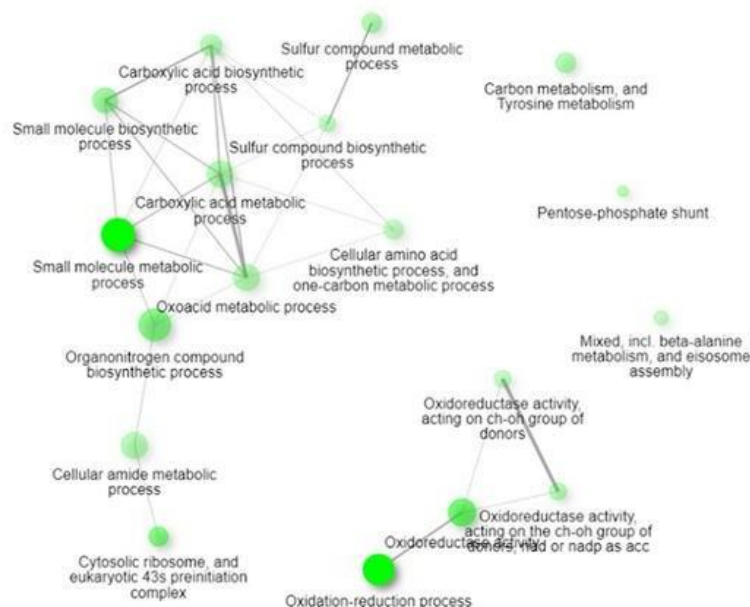


Figura 23. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Cinamaldeído. Os círculos maiores destacam uma frequência maior de proteínas envolvidas no processo e as linhas que ligam os círculos, quando mais espessas, indicam uma maior interação entre os processos que estão conectados. Análise processada pela ferramenta ShinyGO.

Tabela 11. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com cinamaldeído.

Nº de genes	Processos biológicos
4	Processos envolvendo pentose
7	Metabolismo de beta-alanina
9	Biossíntese de compostos sulfúricos
10	Atividade oxirredutase (NAD e NADP)
13	Ribossomos citosólicos
10	Atividade oxirredutase (CO- OH)
13	Metabolismo de compostos sulfúricos
13	Biossíntese de aminoácidos
14	Metabolismo de carbono e tirosina
16	Biossíntese de ácido carboxílico
37	Oxi-redução
22	Biossíntese de pequenas moléculas
28	Atividade oxirredutase
44	Metabolismo de pequenas moléculas
25	Metabolismo de ácido carboxílico
25	Metabolismo de oxiácidos
25	Metabolismo de amidas
40	Biossíntese de compostos nitrogenados

Na amostra tratada com cinamaldeído e itraconazol foram identificadas 359 proteínas expressas exclusivamente no controle, oito expressas exclusivamente no tratamento com ambos os produtos e 46 em comum (Figura 24). As proteínas comuns diferencialmente expressas são representadas no diagrama de Volcano Plot (Figura 25). Na figura 26, observa-se as interações evidenciando os principais processos biológicos envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas no grupo controle e grupo tratado com cinamaldeído + itraconazol. Os processos biológicos que apresentaram maior quantidade de genes/proteínas são atividade oxirredutase, processos de oxirredução, metabolismo de pequenas moléculas, metabolismo de carbono e tirosina e metabolismo de oxiácidos. Na tabela 12, observa-se a quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e cinamaldeído + itraconazol.

Dentre as proteínas menos expressas no controle em relação a amostra tratada com cinamaldeído + itraconazol, destacam-se as relacionadas ao transporte de ATP e ADP, componentes celulares de membrana, transporte de proteínas e manutenção do genoma mitocondrial.

Dentre as proteínas mais expressas no controle destacam-se as relacionadas à fosforilação, glicólise, gliconeogênese, metabolismo de carboidratos, componentes estruturais

de citoplasma e matriz mitocondrial, metabolismo de glicose, regulação de síntese proteica, transporte de proteínas, componentes estruturais do núcleo, metabolismo de triglicerídeos, componentes estruturais de membrana celular, homeostase de glicose e biossíntese de aminoácidos. [OBJ]

Dentre as proteínas expressas exclusivamente no controle, destacam-se as relacionadas à biogênese de ribossomos, biossíntese de riboflavina, componentes estruturais de citoplasma, dobramento de proteínas, atividade catalítica, resposta celular ao estresse químico, componentes estruturais de microtúbulos, biossíntese de aminoácidos e compostos organonitrogenados, síntese de proteínas, proteólise, regulação negativa de formação de hifas, metabolismo de carboidratos, ligação de lipídeos, resposta ao estresse oxidativo, componentes estruturais de vacúolos, componentes estruturais de membrana plasmática, componentes estruturais do citoesqueleto, proteínas de choque térmico, contração de actinmiosina, atividade oxirredutase, biossíntese de esteróides, organização da parede celular, componentes estruturais de núcleo, divisão celular, assimilação de sulfato, exportação de proteínas do núcleo, aparelho de Golgi, organização de vesículas, reparo de proteínas, ligação de cálcio e regulação do ciclo celular.

Na amostra tratada com cinamaldeído e itraconazol, dentre as proteínas exclusivamente expressas destacam-se as relacionadas à síntese de proteínas, constituintes estruturais de ribossomos e divisão celular. Foi observada nessa amostra a presença da enzima 14-alfa-demetilase.

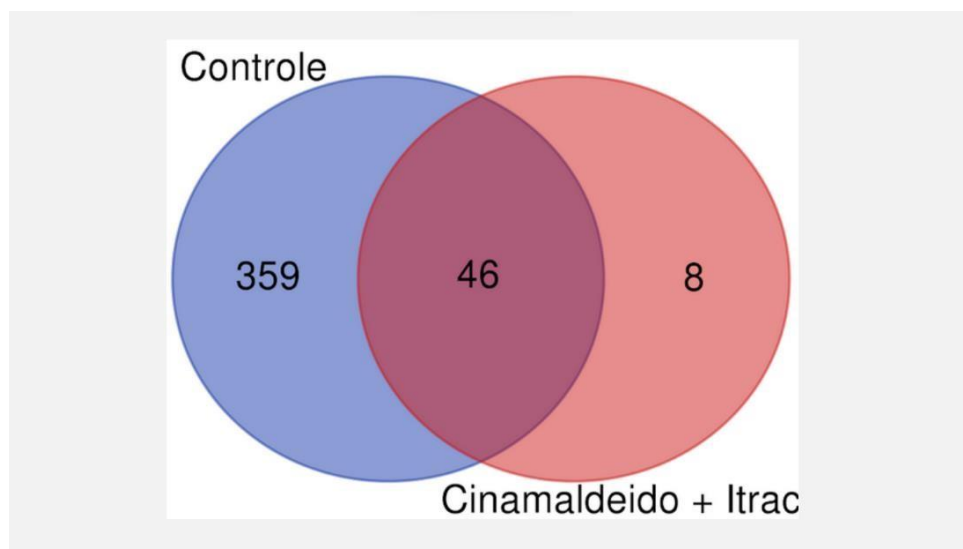


Figura 24. Diagrama de Venn evidenciando 46 proteínas comuns entre os grupos Controle e Cinamaldeído + Itraconazol e as proteínas identificadas apenas em um dos grupos, onde 8 proteínas foram identificadas como exclusivas do grupo Cinamaldeído + Itraconazol e 359 proteínas identificadas como exclusiva do grupo Controle.

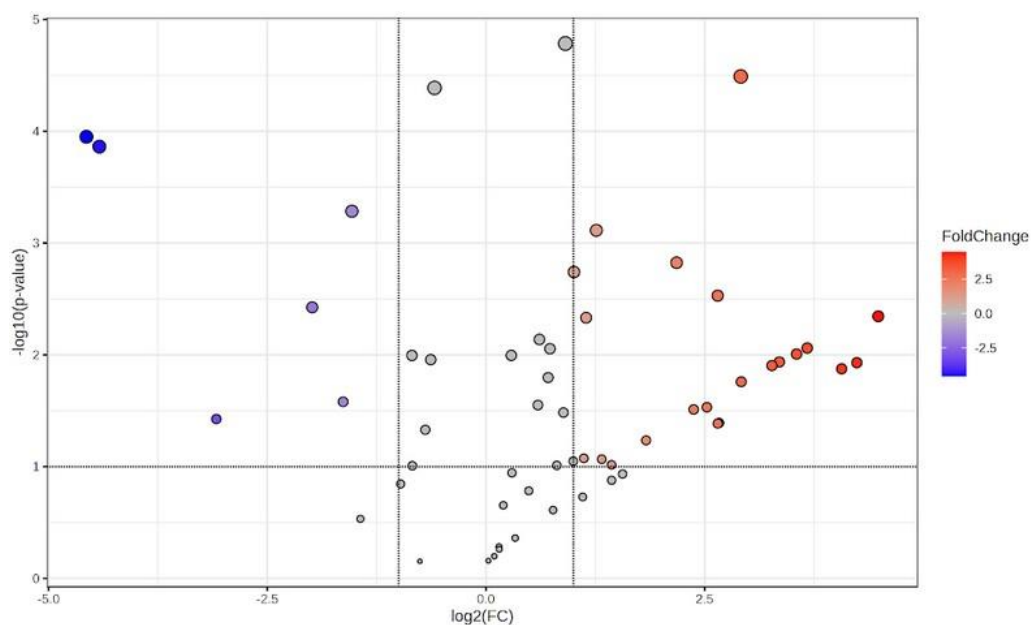


Figura 25. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Cinamaldeído + Itraconazol. Direção da comparação = Controle/Cinamaldeído + Itraconazol. Down - proteínas menos expressas no Controle em relação ao Cinamaldeído + Itraconazol e Up - proteínas mais expressas no Controle em relação ao Cinamaldeído + Itraconazol.

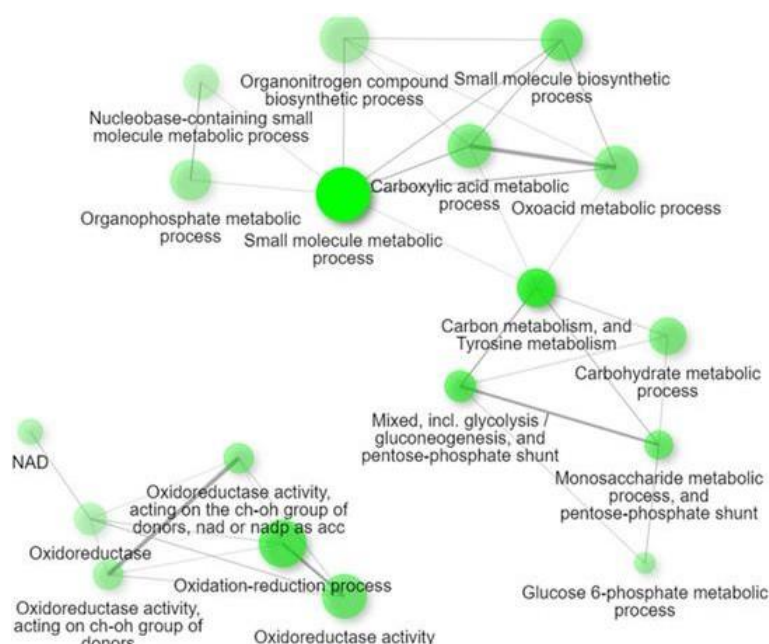


Figura 26. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Cinamaldeído + Itraconazol. Os círculos maiores destacam uma frequência maior de proteínas envolvidas no processo e as linhas que ligam os círculos, quando mais espessas, indicam uma maior interação entre os processos que estão conectados. Análise processada pela ferramenta ShinyGO

Tabela 12. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com cinamaldeído + itraconazol.

Nº de genes	Processos biológicos
11	Metabolismo de glicose
21	Metabolismo de monossacarídeos
16	NAD
26	Glicólise e gliconeogênese
24	Atividade oxidoreductase (NAD e NADP)
43	Metabolismo de carbono e tirosina
24	Atividade oxidoreductase (OH-CH)
28	Oxidoreductase
39	Metabolismo de carboidratos
52	Biossíntese de pequenas moléculas
34	Metabolismo de pequenas moléculas contendo nucleobases
106	Metabolismo de pequenas moléculas
61	Atividade oxidoreductase
59	Metabolismo de ácido carboxílico
73	Oxirredução
49	Metabolismo de organofosforados
59	Metabolismo de oxoácidos
79	Biossíntese de compostos nitrogenados

Na amostra tratada com eugenol e itraconazol foram identificadas 161 proteínas expressas exclusivamente no controle, 159 expressas exclusivamente no tratamento com ambos os produtos e 244 expressas em comum (Figura 27). As proteínas comuns diferencialmente expressas são representadas no diagrama de Volcano Plot (Figura 28). Na figura 29, observa-se as interações evidenciando os principais processos biológicos envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas no grupo controle e grupo tratado com eugenol + itraconazol. Os processos biológicos com maior quantidade de genes/proteínas envolvidos foram biossíntese de compostos nitrogenados e processos relacionados à síntese de ribossomos e manutenção da síntese proteica. Na tabela 13, observa-se a quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e eugenol + itraconazol.

Dentre as proteínas menos expressas no controle em relação ao tratamento com eugenol + itraconazol destacam-se às relacionadas ao retículo endoplasmático, atividades relacionadas ao ATP, constituintes estruturais de ribossomos, biossíntese de ergosterol, metabolismo de lipídeos, componentes de parede celular, homeostase de lipídeos, componentes estruturais de cromatina, ligação de nucleotídeos, regulação negativa da respiração celular, estabilização de proteínas, transporte intracelular de proteínas, proteólise e organização de componentes de parede celular.

Destacam-se, dentre as proteínas mais expressas no controle, as relacionadas à atividade de ATP, gliconeose, processos glicolíticos, transporte nucleoplasmático, microtúbulos, homeostase de glicose, atividade oxirredutase, componentes estruturais do citoplasma, biossíntese de ergosterol, componentes de citosol, proteólise, metabolismo de carboidratos, metabolismo de compostos nitrogenados, proteólise, atividade catalítica, metilação, biossíntese de glicina, transporte mediado por vesículas, assimilação de sulfato, biossíntese de leucina e resposta ao estresse oxidativo.

Dentre as proteínas expressas exclusivamente no controle, destacam-se as relacionadas à assimilação de sulfato, biossíntese de riboflavina, metilação, metabolismo de carboidratos, componentes de núcleo e citoplasma, atividade oxirredutase, biossíntese de cisteína, componentes estruturais de parede celular, resposta ao estresse oxidativo, organização de vesículas, aparelho de Golgi, biossíntese de aminoácidos, transporte de proteínas, ligação de actina, formação de microtúbulos, biossíntese de esteróides e componente celular de membrana.

Dentre as proteínas expressas exclusivamente na amostra tratada com eugenol e itraconazol destacam-se as relacionadas aos constituintes estruturais de ribossomos, reparo de DNA, biossíntese de ergosterol, componentes estruturais de membrana, componentes estruturais de parede celular, proteína relacionada à multirresistência aos fármacos, metabolismo de glicose, biossíntese de componentes de parede celular, divisão celular, resposta a estímulos, componentes estruturais do retículo endoplasmático, constituintes de cromatina, transporte transmembrana e organização de parede celular.

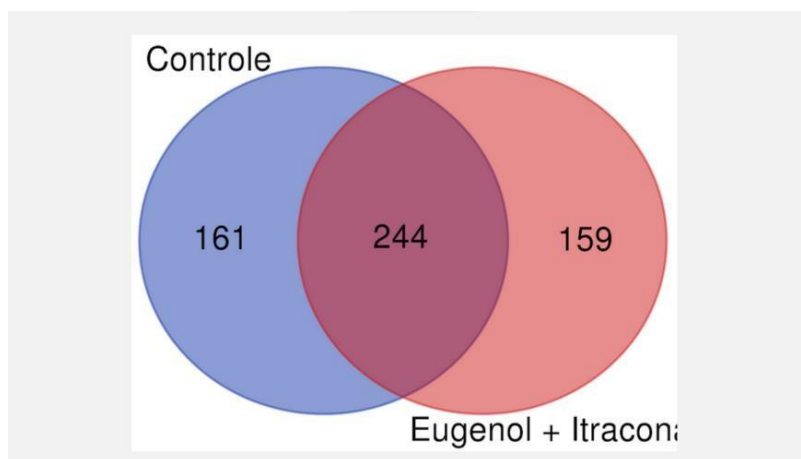


Figura 27. Diagrama de Venn evidenciando 244 proteínas comuns entre os grupos Controle e Eugenol + Itraconazol e as proteínas identificadas apenas em um dos grupos, onde 159 proteínas foram identificadas como exclusivas do grupo Eugenol + Itraconazol e 161 proteínas identificadas como exclusivas do grupo Controle.

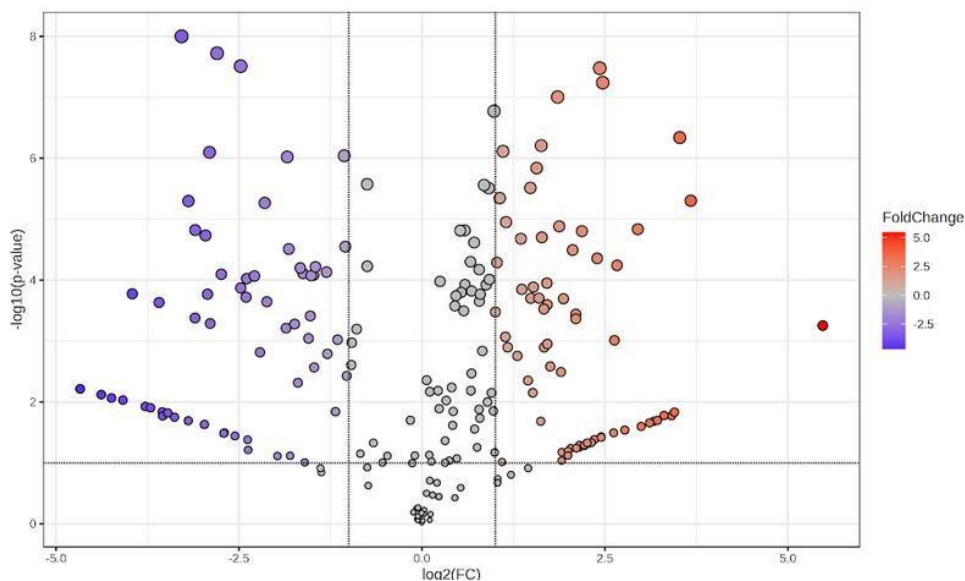


Figura 28. Diagrama de Volcano Plot. Representando as proteínas comuns diferencialmente expressas entre o grupo Controle e o grupo Eugenol + Itraconazol. Direção da comparação = Controle/Eugenol + Itraconazol. Down - proteínas menos expressas no Controle em relação ao Eugenol + Itraconazol e Up - proteínas mais expressas no Controle em relação ao Eugenol + Itraconazol.

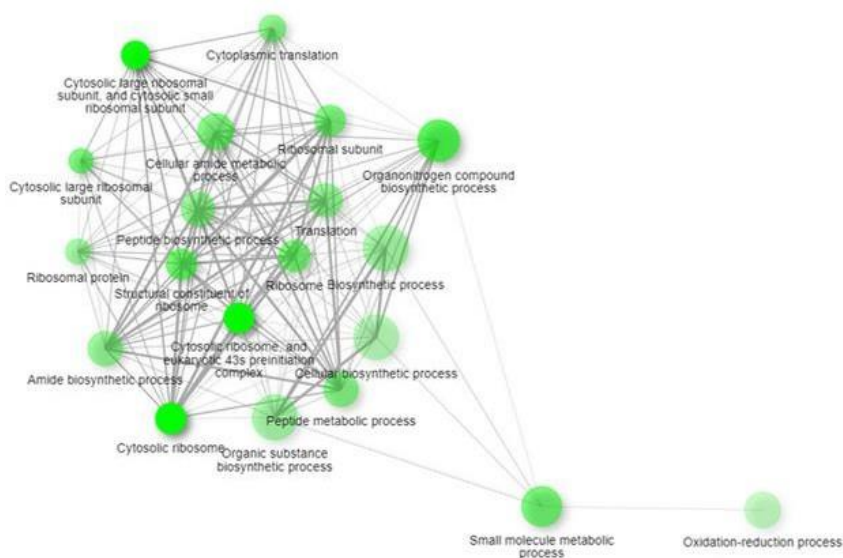


Figura 29. Interação proteína-proteína evidenciando os principais processos biológicos, funções moleculares, componentes celulares e vias de sinalização envolvidos pelas proteínas diferencialmente expressas e exclusivas dos grupos Controle e Eugenol + Itraconazol. Os círculos maiores destacam uma frequência maior de proteínas envolvidas no processo e as linhas que ligam os círculos, quando mais espessas, indicam uma maior interação entre os processos que estão conectados. Análise processada pela ferramenta ShinyGO.

Tabela 13. Quantidade de genes relacionados a cada processo biológico na comparação entre controle e tratamento com eugenol + itraconazol.

Nº de genes	Processos biológicos
43	Subunidades ribossomais
31	Subunidade maior ribossomal
55	Ribossomos citosólicos
52	Iniciação de complexos ribossomais
33	Proteínas ribossomais
39	Síntese de proteínas
54	Constituintes estruturais de ribossomos
54	Subunidades ribossomais
57	Ribossomos
68	Síntese proteica
69	Biossíntese de peptídeos
74	Metabolismo de peptídeos
74	Biossíntese de amidas
84	Metabolismo de amidas
83	Oxirredução
112	Metabolismo de pequenas moléculas
124	Síntese de compostos nitrogenados
158	Síntese de compostos orgânicos
159	Processos biossintéticos
153	Processos biossintéticos celulares

5 DISCUSSÃO

Candida auris apresenta um perfil de sensibilidade peculiar aos antifúngicos. A natureza da resistência antifúngica desta espécie ainda é desconhecida. O número de antifúngicos disponíveis para o tratamento atualmente é muito limitado, sendo quase todos pertencentes às classes de azólicos, polienos, equinocandinas e alilaminas. Além da multirresistência de *C. auris*, um grande problema é o não atendimento a expectativas de tratamento, muitos por sua toxicidade e pela via de administração, exigindo necessidade de aplicação em ambiente intrahospitalar (Hata, Humphries e Lockhart, 2020; Szweda, 2015).

De acordo com o Centers for Disease Control and Prevention (CDC-USA, 2020), todos os isolados de *C. auris* devem ser submetidos a testes de sensibilidade antifúngica. Embora *C. auris* seja comumente multirresistente, os níveis de resistência antifúngica podem variar amplamente entre os isolados. Atualmente não existem pontos de corte de suscetibilidade específicos para *C. auris* estabelecidos pelo CLSI e EUCAST. Os pontos de corte são definidos com base naqueles estabelecidos para espécies de *Candida* estreitamente relacionadas e em sugestões e opiniões de pesquisadores. A correlação entre os pontos de corte microbiológicos e os resultados clínicos ainda não é conhecida. Assim, as informações devem ser consideradas como um guia geral e não como pontos de cortes definitivos para a resistência.

De acordo com os pontos de corte sugerido pelo CDC-USA (2019) neste estudo, todos os isolados de *C. auris* mostraram-se sensíveis à caspofungina (CIM 0,015-0,06 µg/mL) e à anfotericina B (CIM 0,625µg/mL para todos os isolados). Os valores de MIC apresentados frente ao itraconazol foram elevados, variando de 2,5 - 1280 µg/mL, mostrando pouca atividade frente aos isolados estudados.

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

As equinocandinas são incapazes de inibir completamente o crescimento de uma quantidade considerável de isolados de *C. auris*. Quando a resistência a esta classe antifúngica está presente, estão ligados à mutação do gene *FKS1*, que codifica a enzima beta 1,3 D-glucana sintetase (Du et al., 2020).

Além da mutação do gene *FKS*, a redução da sensibilidade de *C. auris* à caspofungina tem sido associada a outra condição, denominada “fenômeno paradoxal” ou “eagle effect”. A maioria dos isolados apresenta o fenômeno paradoxal para a caspofungina nos testes de sensibilidade para esta levedura. Neste estudo, foi observado o fenômeno Eagle em 70,4% dos isolados de *C. auris* frente a caspofungina quando realizado ensaio de microdiluição em caldo. Neste caso, ocorre o crescimento fúngico mesmo em concentrações acima do valor da CIM

para a droga. O fenômeno foi observado em cerca de 25% de isolados de outras espécies de *Candida*, e é associado a ativação de vias alternativas e alterações morfológicas na parede celular, compensando os danos causados na β -1,3-D-glucana, ocasionando um aumento de quitina em até 88% (Dornelas-Ribeiro et al., 2012; Lara-Aguillar et al., 2021; Stevens et al., 2004(a); Stevens et al., 2006(b); Rosenberg et al., 2018; Rueda et al., 2014).

Lara-Aguillar et al., (2021) verificaram o crescimento paradoxal em sete isolados de *C. auris*, três de *C. albicans*, *C. krusei* ATCC 6528 e *C. parapsilosis* ATCC 22019. Todos os isolados de *C. auris* apresentaram o crescimento paradoxal na presença de caspofungina, com isolados apresentando até 77% de crescimento em relação ao controle. Esse fenômeno não foi observado nos isolados de *C. albicans* e controles *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Além disso, foram construídas curvas de sobrevivência para avaliar o comportamento das leveduras durante o período de exposição à caspofungina. Houve um atraso na fase de latência, o que não interferiu com o crescimento final, cuja densidade óptica se assemelhou à do controle não exposto ao antifúngico.

Estes mesmos autores, observaram que a expressão de *FKS1* foi 32 vezes maior que a expressão de *FKS2*. Também foi observado um aumento de quitina com a exposição aos antifúngicos, inclusive em concentrações subinibitórias, mas esse aumento foi mais acentuado em *C. albicans*, sugerindo que a sobrevivência de *C. auris* não é dependente da síntese da quitina como *C. albicans*. Segundo estes autores, a adaptação de *C. albicans* às elevadas concentrações de caspofungina está associada às alterações morfológicas incluindo aumento do volume celular e ausência do desenvolvimento de hifas. A exposição ao antifúngico causou uma inibição acentuada no crescimento de *C. albicans*, cujas células apresentaram um formato irregular. Essas alterações não foram tão evidentes para *C. auris*, sugerindo que nessa espécie os mecanismos que levam ao crescimento paradoxal possam ser diferentes dos observados para *C. albicans*.

Kordalewska et al., (2018) também observaram o fenômeno Eagle em isolados clínicos de *C. auris*. O sequenciamento do gene *FKS* foi realizado para 106 isolados, dos quais 102 foram sensíveis às equinocandinas e apresentaram o genótipo selvagem (*wild-type*). Quatro isolados resistentes à essa classe de antifúngicos apresentaram substituição do aminoácido fenilalanina (S639F) no ponto quente *HS1* do gene *FKS1* bem caracterizado em *C. albicans*.

A susceptibilidade às equinocandinas foi estudada *in vivo*, em modelo murino, para verificação da possível influência do efeito Eagle. Camundongos foram infectados com oito isolados de *C. auris* com diferentes perfis de susceptibilidade de genótipos de *FKS1*, e tratados com uma única dose terapêutica de caspofungina. Após 24 horas de infecção, os camundongos infectados com mutantes *FKS1* S639F não apresentaram resposta ao antifúngico, o que foi

observado pela ausência de diferença da carga renal do fármaco. Camundongos infectados com isolados selvagens para *FKS1* apresentaram redução significativa da carga renal de antifúngico, independentemente dos valores de CIM e da intensidade do efeito Eagle. Esses dados sugerem que o efeito Eagle não interfira no tratamento *in vivo* com caspofungina (Kordalewska et al., 2018).

Ao contrário dos resultados encontrados neste estudo, elevadas CIMs para o poliênico anfotericina B têm sido relatadas em diversos estudos (Lockhart et al., 2019). No entanto, existe uma variabilidade significativa nos valores de CIM para *C. auris* e anfotericina B, assim, recentemente, o CLSI sugeriu que os resultados de suscetibilidade à anfotericina B para *C. auris* devem ser interpretados com cautela, sendo estes valores dependentes da metodologia utilizada (CLSI, 2022).

Candida auris demonstra resistência ao fluconazol, e suceptibilidade variada aos outros agentes azólicos. Embora estudos tenham observado *C. auris* com valores de CIM baixos para itraconazol (Ruiz-Gaitán et al., 2019), neste estudo as CIMs para este antifúngico foram elevadas. Ayala-Gaytán et al. (2020) descreveram um isolado de *C. auris* com valor de CIM alto para este antifúngico. Deshkar et al. (2021) observaram isolados desta levedura com CIMs para itraconazol variando de 0,032-32µg/mL. Outros estudos também relataram variações na susceptibilidade de *C. auris* ao azólico (Kathuria et al., 2016; Lockhart et al., 2017; Chowdhary et al., 2018).

Desde seu isolamento, têm-se buscado alternativas para o tratamento das infecções causadas por *C. auris*. Muitos fármacos utilizados para tratar outras condições, incluindo sertralina, um antidepressivo, e tamoxifeno, utilizado para tratar câncer de mama, foram testados na levedura, além de peptídeos, nanopartículas e produtos naturais. Apesar desses produtos apresentarem ação inibitória em *C. auris*, pouco se sabe a respeito dos mecanismos de ação nesta levedura (De Moraes, 2022).

Estudos demonstraram que o eugenol e seus derivados inibem a produção do ergosterol e também inibem os inibidores da bomba de efluxo em *C. albicans* e o outras *Candida* não *albicans*, resultando na reversão da resistência a drogas entre estes patógenos (Ahmad et al., 2015). Jianhua e Hai (2009) relataram que berberina, baicaleína e eugenol interferem no ciclo celular de *C. albicans*. Com o aumento da concentração de produto natural, a proporção de células em S-G2-M diminui, indicando uma aparente inibição do ciclo celular. Também foi possível observar uma diminuição do tamanho das células e danos celulares através de ensaios de fluorescência de DNA.

Um estudo conduzido por Braga et al. (2007) mostrou que o eugenol apresenta atividade sobre isolados de *Candida albicans*, com uma concentração inibitória mínima de 500 µg/ml.

As células tratadas também apresentaram alterações morfológicas, possivelmente devido às características lipofílicas do eugenol, que penetra na bicamada lipídica da membrana celular, alterando sua permeabilidade e fluidez. Essas alterações na membrana afetam a regulação e função de enzimas que catalisam a síntese de importantes componentes da parede celular, como β -glucanas, mananas e quitina, além de influenciar na morfogênese do envelope celular dessas leveduras. As alterações no envelope reduzem a adesividade de *C. albicans* e a formação de hifas, reduzindo sua habilidade de colonizar tecidos (Kamatou et al., 2012).

Shreaz et al. (2011) descreveram que o cinamaldeído apresenta CIM entre 100 e 500 $\mu\text{g/ml}$ em isolados de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. guilliermondii* resistentes ao fluconazol, mostrando uma ação fungicida. Houve uma diminuição dose-dependente da quantidade de ergosterol em linhagens cultivadas com cinamaldeído, sugerindo que um de seus possíveis mecanismos de ação é a desestabilização da membrana celular. O produto também afeta a ação da enzima H^+ -ATPase, importante para o transporte de nutrientes, resultando em acidificação e morte celular.

Alves et al. (2020) também demonstraram que cinamaldeído apresenta uma ação inibitória fungicida em isolado de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, com concentrações variando entre 18,91 e 37,83 μM . Os valores de CIM elevados nos testes de sorbitol, que atua como um protetor osmótico, sugerem que a parede celular é um possível alvo do cinamaldeído. Outro possível mecanismo de ação pode estar relacionado com a afinidade de produto com a afinidade pela esqualeno-epoxidase.

Neste estudo, os ensaios de susceptibilidade com *C. auris* frente aos produtos naturais, mostraram que para todos os isolados testados, os valores de CIM foram os mesmos obtidos para CFM, tanto para o eugenol como para o cinamaldeído, mostrando, portanto, uma atividade fungicida destes compostos.

Poucos são os relatos da ação de produtos naturais em cepas de *C. auris*, porém alguns dados corroboram os achados deste estudo em relação a atividade fungicida do eugenol e cinamaldeído em isolados de *C. auris*. Alam et al. (2023) realizaram estudo com derivado do eugenol (tosilato de eugenol – C5) identificando-o como um derivado ativo, com baixos valores de CIM frente a todos os isolados de *C. auris* estudados. Além disso, os autores também constataram a atividade fungicida e que o derivado ocasionou a apoptose nos isolados de *C. auris*.

Liu et al. (2020), avaliando isolados de *C. auris* e *C. albicans*, demonstraram o efeito anti-*Candida* e o potencial de induzir a remodelação da parede celular de cinco compostos naturais, entre eles o cinamaldeído, destacando a possibilidade da aplicação *in vivo* contra infecções associadas a esses fungos. Miranda-Cadena et al. (2021b) relataram que

nanopartículas de lipossomas com cinamaldeído a uma concentração de 36 µg/mL e 64 µg/mL de lipídeos apresentam ação contra isolados de *Candida* spp. incluindo *C. auris*, com ausência de citotoxicidade aos macrófagos nessa concentração.

Uma alternativa promissora para tratar as infecções causadas por *Candida* spp. é a terapia combinada, possibilitando a redução da dose e citotoxicidade de ambos os compostos (De Moraes, 2022). Neste estudo, a avaliação do sinergismo demonstrou que, em combinação com o itraconazol, os produtos naturais apresentaram uma atividade sinérgica fungicida, de acordo com a redução de log de UFC/mL. As combinações entre eugenol e cinamaldeído apresentaram atividade sinérgica fungistática.

Khan et al. (2019) demonstraram que o eugenol em combinação com a anfotericina B apresenta uma atividade contra *C. albicans*, além de causar a liberação de espécies reativas de oxigênio e hiperpolarização mitocondrial. A anfotericina B sozinha apresentou concentração inibitória mínima e fungicida em torno de 8 e 16 µg/ml, enquanto os valores para eugenol foram respectivamente 625 e 1250 µg/ml. Na combinação com 0,05 µg/ml de antifúngico, o eugenol apresentou redução de 75% nas concentrações inibitórias mínima e fungicida, com valores de 156 e 312 µg/ml, respectivamente. A ação de anfotericina B é mais duradoura quando em combinação com eugenol e os danos celulares observados são mais severos quando ambos os produtos são utilizados em conjunto em relação ao uso dos produtos separadamente.

Shaban et al. (2020) avaliaram a atividade antifúngica combinada de quatro compostos fenólicos com drogas antifúngicas frente a isolados de *C. auris*. Entre os produtos testados o eugenol não se mostrou um composto ativo para estudos de sinergismo com os antifúngicos anfotericina B, caspofungina, fluconazol e nistatina.

Di Vito et al. (2023) pesquisaram o efeito sinérgico do cinamaldeído com antifúngico fluconazol em isolados de *C. auris* e relataram sinergismo positivo do composto com esta droga. Porém, os autores ressaltaram que maiores estudos ainda são necessários para avaliar, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, a eficácia e os mecanismos de ação do composto para que represente um recurso válido na luta contra a propagação de *C. auris* e suas resistências.

Constitui-se de grande importância e interesse estudos do potencial patogênico da levedura envolvendo a adesão, multiplicação e invasão como possível meio para o desenvolvimento de novas intervenções terapêuticas contra infecções por *Candida*.

A capacidade das espécies de *Candida* produzirem biofilmes em superfícies bióticas e abióticas é considerada um de seus fatores de virulência mais importantes, uma vez que a penetração de antifúngicos nas camadas mais profundas de biofilmes é diminuída, agravando a emergência de isolados com susceptibilidade reduzida aos antifúngicos (Didehdar et al., 2022).

Os produtos naturais têm sido amplamente estudados para verificar sua atividade antibiofilme em espécies de *Candida*. Karpinski et al., (2021), em um trabalho de revisão, verificaram que pelo menos 34 preparados a partir de plantas, incluindo extratos e óleos essenciais, apresentam uma atividade antifúngica, inibindo pelo menos 50% de biofilme em relação ao controle. O óleo essencial de *Allium sativum* L. causa uma redução em uma concentração de 60 mg/mL no biofilme produzido por *C. albicans*. O extrato de *Copaifera paupera* ocasiona redução em uma concentração de 48, 87 mg/mL em biofilmes produzidos pela mesma espécie. Óleos essenciais obtidos a partir de espécies de *Eucalyptus* apresentam atividade anti-*Candida albicans*, reduzindo a formação de biofilme em uma concentração de 8 mg/mL. O óleo essencial de *Lavandula dentata* L. reduz a produção de biofilme em concentrações variando entre 0,045 e 0,07 mg/mL também para a mesma espécie. O óleo essencial de *Satureja macrosiphon* ocasiona uma redução de biofilme produzido por *C. dubliniensis* e *C. albicans* em concentrações entre 2 e 8 mg/mL.

Neste estudo, quatro isolados de *C. auris* apresentaram uma redução na biomassa de biofilme maior que 50% quando tratados com eugenol em uma concentração de 75% da concentração inibitória mínima. Os demais isolados apresentaram uma inibição de cerca de 40% na mesma concentração.

He et al., (2007) demonstraram que o eugenol reduz a capacidade de adesão de biofilmes produzidos por *C. albicans*, além de inibir a filamentação por essa espécie, também um fator de virulência importante para a patogênese de infecções invasivas.

Shahina et al. (2022) também demonstraram que o eugenol dificulta a formação de tubos germinativos e hifas, bem como o citral. Em um estudo conduzido por Rangel et al., (2018) eugenol também demonstrou um efeito promissor contra *C. tropicalis* e multi-espécies. Esse composto diminuiu a adesão inicial, formação de tubo germinativo e progressão do desenvolvimento de biofilme, além de danos na parede celular, inibição de biofilme já estabelecido e diminuição do tamanho celular (Wijesinghe et al., 2020).

Jafri et al., (2019) demonstraram que o eugenol apresenta ação frente biofilmes simples e mistos de *Streptococcus mutans* e *C. albicans* resistente à anfotericina B, cetoconazol e itraconazol. O tratamento com eugenol ocasionou alterações na morfologia celular tanto dos biofilmes simples como dos biofilmes mistos. De Paula et al., (2014) também demonstraram uma atividade de eugenol frente à biofilmes produzidos por espécies de *Candida*. O eugenol apresentou ação contra células planctônicas e sésseis de *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Foi observada uma redução de mais de 80% na atividade metabólica de células sésseis após 24 horas de tratamento com eugenol em concentrações entre 187,5 à 750 µg/mL. E nenhuma

atividade metabólica foi detectada quando o tratamento consistiu em concentrações até 1500 µg/mL.

Também é relatada a atividade do cinamaldeído contra biofilmes produzidos por espécies de *Candida*. Neste estudo, cinco isolados apresentaram uma redução de biomassa de biofilme maior que 70% quando tratados com cinamaldeído em uma concentração de 75% da CIM em relação ao controle. Dois isolados apresentaram uma redução menor que 50% enquanto os demais isolados apresentaram uma redução entre 50% e 70% de biomassa de biofilme na concentração de 75% da CIM. Gupta et al., (2018) demonstraram que o composto, além de comprometer a formação de clamidioconídios e pseudo-hifas, ocasionar lise celular e aumentar a produção de compostos reativos de oxigênio, também compromete a formação de biofilmes produzidos por *C. glabrata* em biomateriais, como cateteres urinários e lentes de contato. Em uma concentração de 256 µg/mL, o cinamaldeído foi capaz de inibir mais de 75% do biofilme produzido por um isolado clínico da espécie.

Miranda-Cadena et al., (2021a), demonstraram que o cinamaldeído além de apresentar atividade fungicida contra células planctônicas, é capaz de comprometer a adesão de biofilmes produzidos por espécies de *Candida*. O composto foi capaz de reduzir a atividade metabólica bem como a biomassa de biofilmes produzidos por *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. tropicalis*, em uma concentração de 118,5 µg/mL para XTT e 1896,2 µg/mL para cristal violeta. Khadke et al. (2022) verificaram que análogos de cinamaldeído apresentam ação em biofilmes produzidos por *C. albicans* em uma concentração variando entre 20 e 50 µg/mL, reduzindo o biofilme em até 90%, diferentemente do trans-cinamaldeído, que também foi analisado neste estudo e nessas mesmas concentrações não reduziu a formação de biofilme.

Embora sejam poucos os estudos, os produtos naturais também têm sido analisados com relação à sua atividade anti-biofilme em isolados de *C. auris*. Kim et al., (2020) verificaram a ação do composto 6-shogaol em biofilmes produzidos pela espécie. A biomassa de biofilme foi reduzida entre 78,1 e 79,9% quando os biofilmes foram tratados com concentrações do composto variando entre 32 e 64 µg/mL. A atividade metabólica foi reduzida em até 97,6% com uma concentração de três vezes a concentração inibitória mínima. O composto também apresenta capacidade de erradicar o biofilme estabelecido em até 97,9% em uma concentração de 64 µg/mL.

Nos estudos conduzidos por Kuhn et al. (2002) e Li et al. (2003) foram observadas divergências entre os ensaios de atividade metabólica e de massa de biofilme, bem como no presente estudo. Para ambos os estudos, foi observado que biofilmes produzidos por isolados obtidos de diferentes locais, como vagina, cavidade oral, próteses dentárias, cateteres e sangue

que apresentaram baixos valores nos ensaios de XTT, apresentaram valores elevados nos ensaios de cristal violeta e vice-versa.

Neste estudo, o ensaio do XTT mostrou um aumento expressivo na atividade metabólica em cinco isolados quando tratados com eugenol. Três isolados apresentaram um aumento de atividade metabólica menos expressivo e apenas três isolados apresentaram uma discreta diminuição de atividade metabólica quando tratados com eugenol. Cinco isolados apresentaram uma leve diminuição de atividade metabólica quando tratados com cinamaldeído. Os demais isolados apresentaram aumento de atividade metabólica, sendo que três isolados (4, 6 e 12) apresentaram um aumento expressivo, entre 70 e 97%.

O ensaio de XTT é realizado para avaliar o nível de metabolismo oxidativo, e por meio dele é possível verificar a extensão do crescimento de biofilmes maduros. Porém, o método não é adequado para avaliar a massa, volume, espessura, diferenciação celular, arquitetura ou extensão da deposição do biofilme. Apesar de sua reprodutibilidade ser comprovada, a comparação com métodos de verificação de extensão de biofilme não é adequada. O ensaio de cristal violeta tem como principais alvos os mucopolissacarídeos e amilóides, que podem variar consideravelmente como resultado de diferenças na deposição da matriz (Soll e Daniels, 2016).

De acordo com Raut et al. (2012), a intensidade da absorbância de cristal violeta é proporcional à massa celular, seja de células vivas ou não e substâncias poliméricas extracelulares. Embora tenha ocorrido uma redução de biomassa de biofilme nos isolados analisados neste estudo, foi observado um aumento de atividade metabólica. Essas características observadas ressaltam que houve uma redução do número de células e matriz extracelular, mas essa redução não necessariamente está associada à uma redução de atividade metabólica. Gabriela et al., (2014) avaliaram a ação do extrato de *Zuccagnia punctata*, uma planta medicinal argentina em biofilmes produzidos por *C. albicans*. A redução da biomassa de biofilme foi mais significativa do que a redução de atividade metabólica, assim como observado no presente estudo.

Neste estudo, o eugenol não apresentou citotoxicidade nas concentrações variando de 15,625 a 125 µg/mL. Nessas concentrações a viabilidade celular foi superior a 70%. Entretanto, nas concentrações de 250 e 500 µg/mL, a viabilidade celular foi de 65,96 e 5,74% respectivamente. O cinamaldeído apresentou maior citotoxicidade em relação ao eugenol. Nas concentrações de 62,5, 125, 250 e 500 µg/mL, a viabilidade celular foi reduzida para cerca de 4,5%. Na concentração de 31,25 µg/mL, a viabilidade celular foi de 33,45% e na concentração de 15,625 µg/mL a viabilidade foi de 94,42%.

Shahabadi et al., (2019) avaliaram a citotoxicidade de eugenol puro e nanopartícula através do método de MTT contendo magnetita (Fe₃O₄SiO₂) em células cancerígenas: astrócitos

provenientes de glioblastoma, células de carcinoma pulmonar e de carcinoma ovariano. Eugenol foi menos citotóxico do que a nanopartícula em ambos os tipos celulares. A viabilidade celular dos astrócitos permaneceu em mais de 70% com tratamento na dose de 200 µg/mL. Nas células ovarianas a viabilidade celular permaneceu em cerca de 70% após uma exposição de 50 µg/mL e para as células pulmonares a viabilidade foi de cerca de 65% também em uma exposição de 50 µg/mL.

Gundel et al., (2019) avaliaram a citotoxicidade do eugenol puro e em nanoemulsão com o mancozeb, um fungicida comumente utilizado na agricultura, em células mononucleares do sangue. A viabilidade celular permaneceu em torno de 100% nas concentrações de 0,5, 5 e 50 µg/mL. Em uma concentração de 500 µg/mL a viabilidade celular permaneceu em torno de 70%. A viabilidade celular também permaneceu em torno de 100% para a nanoemulsão de eugenol nas mesmas concentrações que para o eugenol puro. Na concentração de 500 µg/mL a viabilidade caiu para cerca de 50%. A combinação de eugenol e mancozeb também manteve a viabilidade celular superior a 70% para várias combinações entre ambos os produtos. Para a nanoemulsão combinando ambos os produtos, a viabilidade celular variou entre 45 e 100% para diferentes combinações.

Kar et al., (2021) avaliaram a possível citotoxicidade de oleato de eugenol em combinação com a anfotericina B através da coleta de sangue de camundongos tratados com ambos os compostos e avaliação de parâmetros bioquímicos para verificação das funções hepática e renal, incluindo testes para alanina transaminase, aspartato aminotransferase, ácido úrico e creatinina. Os níveis séricos de ambos os parâmetros apresentaram-se de acordo com a normalidade, indicando que não ocorreu citotoxicidade para células renais e hepáticas.

A possível citotoxicidade de uma emulsão de eugenol também foi avaliada por Gao et al., (2020) em células PC12 de feocromocitomas (tumores secretores de hormônios) de ratos. Em concentrações variando entre 0,2 e 50 µg/mL a nanoemulsão não demonstrou citotoxicidade. A viabilidade celular permaneceu em torno de 100% em todas as concentrações testadas. Fuentes et al., (2021) avaliaram a citotoxicidade de partículas de sílica conjugadas com eugenol e vanilina e dos compostos puros em células HepG2 (hepatocarcinoma). Os valores de IC₅₀ foram de 0,1 mM para o eugenol em 24 e 48 horas de exposição. Dentre as combinações com os compostos majoritários de óleos essenciais, a viabilidade celular variou de acordo com o tipo de partícula e sua composição. As partículas de material cristalino móvel apresentaram maior variabilidade na quantidade de células viáveis. As partículas de sílica amorfa sintética conjugadas com eugenol apresentaram viabilidade celular em torno de 50%. Os resultados sugerem que o eugenol puro é menos citotóxico do que em combinação com as partículas avaliadas.

A conjugação de nanodiamantes com eugenol em concentrações variando entre 100 e 1000 µg/mL em macrófagos murinos através de análise por cristal violeta não apresentou citotoxicidade após uma exposição de 24 horas. A viabilidade celular permaneceu entre 85 e 100% para combinações entre ambos os produtos em diferentes proporções. Os resultados sugerem menor taxa de ruptura da membrana plasmática, lisossomiais e mitocondriais (Lim et al., 2016).

Maurice et al., (2021) verificaram a possível citotoxicidade de eugenol e uma nanoemulsão em macrófagos através de análise pelo método de MTT. Na menor concentração testada de eugenol, de 0,2 µL/mL, a viabilidade celular foi de 95,3% e na maior concentração, de 1 µL/mL, a viabilidade foi de 91,67%. Para as nanoemulsões de eugenol, a viabilidade celular foi de 96,3 e 92,3% para as concentrações de 0,2 e 1 µL/mL, respectivamente.

Wani et al. (2022) avaliaram o efeito de um derivado azólico à base de cinamaldeído na viabilidade e morte celular em isolados de *C. auris*. Os resultados confirmaram que o composto possuía a concentração inibitória mínima de 0,98 µg/mL e impediu o crescimento da levedura bem como causou a morte das células, podendo ser considerado um forte candidato para o desenvolvimento de drogas antifúngicas contra *C. auris*.

Alves et al., (2021b) avaliaram a citotoxicidade de cinamaldeído em *Galleria mellonella* e em zebrafish. Em *G. mellonella*, o composto não foi tóxico até a maior concentração testada, de 20 µg/mL, enquanto para embriões de zebrafish, a toxicidade ocorre em concentrações de 0,035 µg/mL, causando atraso na eclosão dos ovos. Na concentração de 0,105 µg/mL causa edemea pericárdico nesses animais, além de causar malformações e diminuir a sobrevivência desses embriões. A toxicidade do cinamaldeído também foi avaliada em mucosa oral queratinizada de ratos e não houve danos nos tecidos até a maior dose avaliada, de 700 µg/mL. Análises histológicas de palato demonstraram a preservação da epiderme, queratinócitos e células basais.

Pereira et al., (2021) avaliaram a possível citotoxicidade do cinamaldeído em células Vero e Hep-2. Em concentrações variando entre 0,187 e 6 µg/mL não houve redução da viabilidade celular para ambas as linhagens após 48 horas de exposição. Polaquini et al., (2017) avaliaram a toxicidade de derivados de cinamaldeído em fibroblastos pulmonares humanos. As concentrações que mataram 50% das células de dois derivados do produto foram 46,3 e 53,1 µM. Sawicki et al., (2018) também avaliaram a possível citotoxicidade de cinamaldeído e óleo essencial de canela em células Vero após 24 horas de exposição. Os valores de IC₅₀ para cinamaldeído e óleo essencial foram de 112,6 e 69,35 µg/mL respectivamente.

Zhang et al., (2010) verificaram a citotoxicidade de *trans*-cinamaldeído em eritrócitos derivados de pacientes com leucemia (K562) através de análise de citometria de fluxo. O

tratamento com 180 $\mu\text{mol/L}$ por nove horas levou à uma taxa de apoptose de cerca de 9%. O tratamento por 24 horas ocasionou uma taxa de apoptose de 18,6% com 120 $\mu\text{mol/L}$ e de 38,98% com 180 $\mu\text{mol/L}$.

O cinamaldeído é utilizado como aditivo alimentar e classificado como seguro pela Food and Drug Administration (FDA). Entretanto, há relatos demonstrando a citotoxicidade do composto para alguns tipos celulares e estudos demonstrando que não ocorre comprometimento celular. Essa aparente contradição pode ser explicada pela natureza química do cinamaldeído, que possui um grupo alifático aldóxila, apresentando elevada reatividade. Compostos do grupo dos aldeídos apresentam diversidade de reações químicas e as misturas apresentam complexidade, sendo variável de acordo com a região geográfica. Estudos utilizando derivados de cinamaldeído são comuns, possivelmente porque esses derivados podem apresentar maior estabilidade (LoPachin e Gavin, 2014; Polaquini et al., 2017).

Os mecanismos de ação dos produtos naturais sobre as proteínas ainda não são bem elucidados, sendo necessário estudos moleculares, em especial, o estudo do proteoma para a complementação aos estudos fisiológicos e de genômica permitindo examinar simultaneamente as alterações e classificar padrões temporais de acúmulo ou diminuição de proteínas que ocorrem durante o processo de ação destes produtos.

Hoehamer et al., (2010) avaliaram a expressão de proteínas de *C. albicans* quando tratada com cetoconazol. A maioria das proteínas estava relacionada ao metabolismo de carboidratos, biossíntese de proteínas e proteínas de choque térmico. Semelhantemente ao presente estudo, também foram identificadas proteínas envolvidas na biossíntese de ergosterol, de resposta ao estresse celular e proteínas relacionadas à resistência aos antifúngicos.

Song et al., (2022) verificaram as proteínas diferencialmente expressas de *C. albicans* após a exposição ao fluconazol. Proteínas relacionadas à biossíntese de aminoácidos foram reguladas positivamente. Proteínas relacionadas à resistência aos azólicos também foram diferencialmente expressas de maneira positiva. Neste estudo, estes achados também foram observado após o tratamento com itraconazol.

Estudos relacionados à proteômica de outras espécies de fungos em resposta à exposição aos antifúngicos também têm sido realizados. Gautam et al., (2016) avaliaram a resposta de *Aspergillus fumigatus* ao itraconazol. Dentre as proteínas diferencialmente expressas, destacam-se as relacionadas ao metabolismo de carboidratos e aminoácidos, resposta ao estresse celular, proteínas relacionadas ao citoesqueleto e à parede celular, bem como no presente estudo.

Poulsen et al., (2021) verificaram a ação nas proteínas expressas por *A. niger* em

resposta ao itraconazol. A expressão de transportadores do tipo ABC, relacionadas a bombas

de efluxo foi aumentada, e a síntese de ergosterol foi diminuída, dados que também foram observado neste estudo.

Os achados relacionados às proteínas expressas exclusivamente no controle corroboram com o conhecido mecanismo de ação dos azólicos, que interferem na síntese de ergosterol da membrana plasmática. Foram observadas proteínas, dentre as expressas exclusivamente na amostra tratada com itraconazol, relacionadas à expressão de bombas de efluxo e resposta ao estresse à estímulos, também corroborando com mecanismos de resistência aos azólicos (Aris et al., 2017; Bandara e Samaranayake, 2022; Houst et al., 2020)

Neste estudo, foi observada uma redução na biossíntese de componentes da membrana celular na amostra tratada com eugenol, sugerindo que a síntese de ergosterol pode ser um dos alvos do composto. Prajapati et al., (2023) verificaram que ocorre uma interação de eugenol com um grupo heme da proteína CYP51B de *Rhizopus oryzae*, importante para a síntese de ergosterol, *in vitro* e *in silico*, através de docking molecular.

Poucos são os estudos verificando os possíveis mecanismos de ação do eugenol e cinamaldeído em espécies de fungos. Dentre esses estudos, outras estratégias são utilizadas para verificar a interação do composto com as células fúngicas.

Biernasiuk et al., (2023) verificaram o comportamento de *Candida spp.* quando tratadas com eugenol na presença e na ausência de sorbitol, um protetor osmótico importante para estabilização celular em situações de estresse. Esse ensaio é utilizado para avaliar se determinado agente antifúngico apresenta ação na parede celular. Os autores verificaram que não houve alteração nos valores de CIM na presença de sorbitol, indicando que possivelmente, a parede celular não é um alvo do eugenol. Por meio de ensaios envolvendo a formação de complexos entre ergosterol e compostos com atividade antifúngica, é possível determinar se esses compostos são capazes de interferir na síntese de ergosterol. Os autores verificaram valores de CIM mais elevados no tratamento com o eugenol, sugerindo que a síntese de ergosterol pode ser um dos alvos do composto.

No presente estudo foi observado que proteínas relacionadas à síntese e manutenção de membrana celular foram encontradas no grupo controle e não foram encontradas no grupo tratado com cinamaldeído. Alves et al., (2020) avaliaram os possíveis mecanismos de ação de cinamaldeído através de docking molecular em *Candida spp.* Suas análises demonstraram uma afinidade do cinamaldeído pela enzima esqualeno-epoxidase, sugerindo que seu mecanismo de ação possivelmente é a inibição da síntese de ergosterol.

Biernausiuk et al., (2023) também verificaram a interação do óleo essencial de cravo em *Candida spp.* através de experimentos utilizando o sorbitol e complexos de ergosterol. Assim como para o eugenol, seus resultados sugeriram que possivelmente a parede celular não é um

dos alvos de ação do cinamaldeído. No ensaio de ergosterol, a CIM foi elevada para cinamaldeído em relação aos ensaios onde foi verificada a atividade antifúngica, indicando que a membrana plasmática possivelmente é o alvo de ação do cinamaldeído.

Neste estudo, as interações entre eugenol e cinamaldeído, eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol apresentaram uma ação fungicida na cepa CDC B11903. Entretanto, para a análise proteômica, foram utilizadas concentrações menores em relação às utilizadas no ensaio para verificação de sinergismo de ambos os produtos e de antifúngico. Esse fato pode explicar a presença de proteínas relacionadas à síntese de compostos importantes de membrana plasmática, como a 14-alfa-demetilase e a aparente contradição com os dados obtidos nas amostras tratadas apenas com eugenol e apenas com cinamaldeído. Possivelmente as interações entre eugenol e itraconazol e cinamaldeído e itraconazol não atuam na membrana plasmática, como os produtos isolados, e seus mecanismos de ação ainda precisam ser elucidados em estudos futuros.

6 CONCLUSÕES

Neste estudo, as linhagens foram sensíveis à anfotericina B e à caspofungina. Entretanto, a inibição do crescimento não foi total para a caspofungina, observando-se um crescimento residual em concentrações intermediárias, denominado “efeito eagle” ou “fenômeno paradoxal”. Eugenol e cinamaldeído apresentaram ação fungicida para todos os isolados e ação sinérgica entre si e com o itraconazol, reduzindo consideravelmente a quantidade de colônias. Esses resultados estão de acordo com dados encontrados na literatura a respeito da ação de ambos os compostos em espécies de *Candida*. Ambos os produtos causaram uma redução na produção de biomassa de biofilmes produzidos por *C. auris*. Entretanto, a atividade metabólica de biofilme da maioria dos isolados foi aumentada quando tratados com eugenol e cinamaldeído. O eugenol não apresentou citotoxicidade de *C. auris* para células. Cinamaldeído apresentou citotoxicidade nas concentrações em que ocorre inibição da levedura. Os achados estão de acordo com dados de outros estudos, confirmando a segurança de eugenol e redução de viabilidade celular em diferentes tipos celulares quando expostas ao cinamaldeído. Os achados sugerem que, eugenol e cinamaldeído, possivelmente atuam inibindo a síntese de ergosterol, assim como os azólicos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams E, Quinn M, Tsay S, Poirot E, Chaturvedi S, Southwick K. et al. *Candida auris* in healthcare facilities, New York, USA, 2013–2017. **Emerging Infectious Diseases**, 2018.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa no 02/2020. Confirmação de caso de *Candida auris* no Brasil. Disponível em:<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/alerta-02-2020-candida-auris-09-12-2020.pdf>>. Acesso em 16/11/2023.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa no 01/2021. Confirmação de novo caso de *Candida auris* no Brasil Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa no 01/2021. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/alerta-candida-auris-dezembro-de-2021.pdf>>. Acesso em 16/11/2023.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa nº 01/2022: confirmação de caso de *Candida auris* em Hospital de Pernambuco. Disponível em:<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/alerta-de-risco-gvims-ggtes-anvisa-no-01-2022>>. Acesso em 16/11/2023.

Agência Nacional De Vigilância Sanitária (ANVISA). Alerta de Risco GVIMS/GGTES/Anvisa nº 01/2023. Confirmação de caso de *Candida auris* em Hospital de São Paulo. Disponível em:<<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/servicosdesaude/comunicados-de-risco-1/alerta-candida-auris-em-sp-09-06-2023.pdf>>. Acesso em 16/11/2023.

Ahmed A, Wani MY, Khan A, Manzoor N, Molepo J. Synergistic Interactions of Eugenol-tosylate and Its Congeners with Fluconazole against *Candida albicans*. **PLoS One**, 2015.

Alam H, Srivastava V, Sekgele W, Wani MY, Al-Bogami AS, Molepo J, Ahmad A. Cellular apoptosis and cell cycle arrest as potential therapeutic targets for eugenol derivatives in *Candida auris*. **PLoS one**, v. 18, 2023.

Alves DN, Monteiro AFM, Andrade PN, Lazarini JG, Abílio GMF, Guerra FQS, Scotti MT, Scotti L, Rosalen PL, De Catro RD. Docking Prediction, Antifungal Activity, Anti-Biofilm Effects on *Candida* spp., and Toxicity against Human Cells of Cinnamaldehyde. **Molecules**, v.

25, 2020.

Alves DN, Martins RX, Ferreira ES, Alves AF, Andrade JC, Batista TM, Lazarini JG, Amorim LS, Rosalen PL, Farias DF, Castrop RD. Toxicological Parameters of a Formulation Containing Cinnamaldehyde for Use in Treatment of Oral Fungal Infections: An In Vivo Study. **BioMed Research International**, 2021.

Arif T, Bhosale JD, Kumar N, Mandal TK, Bendre RS, Lavekar GS, Dabur R. Natural products –antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v.11, 2009.

Aris P, Wei Y, Mohamadzadeh M, Xia X. Griseofulvin: An Updated Overview of Old and Current Knowledge. **Molecules**, v. 27, 2022.

Arora P, Singh P, Wang Y, Yadav A, Pawar K, Singh A, Padmavati G, Xu J, Chowdhary A. Environmental Isolation of *Candida auris* from the Coastal Wetlands of Andaman Islands, India. **mBio**, v. 2, 2021.

Atsumi T, Fujisawa S, Tonosaki K. A comparative study of the antioxidant/prooxidant activities of eugenol and isoeugenol with various concentrations and oxidation conditions. **Toxicology in vitro**, 2005.

Ayala-Gaytán JJ, Montoya AM, Martínez-Resendez MF, Guajardo-Lara CE, De J Treviño-Rangel R, Salazar-Cavazos L, Llaca-Díaz JM, González GM. First case of *Candida auris* isolated from the bloodstream of a Mexican patient with serious gastrointestinal complications from severe endometriosis. **Infection**, v. 49, p. 523-525, 2021.

Bapat PS, Nobile CJ. Photodynamic Therapy is Effective Against *Candida auris* Biofilms. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 2021.

Bandara N, Samaranayake L. Emerging and future strategies in the management of recalcitrant *Candida auris*. **Medical Mycology**, v. 60, 2022.

Bang K, Lee D, Park H, Rhee Y. Inhibition of Fungal Cell Wall Synthesizing Enzymes by *trans*-Cinnamaldehyde. **Bioscience, Biotechnonology, and Biochemistry**, v. 64. P. 1061-1063, 2000.

Barber AE, Riedel J, Sae-Ong T, Kang K, Brabetz W, Panagiotou G, Deising HG, Kurzai O. Effects of Agriculture Fungicide Use of *Aspergillus fumigatus* Abundance, Antifungal Susceptibility, and Population Structure. **mbio**, 2020.

Beardsley J, Halliday CL, Chen SCA, Sorrel TC. Respondind to the emergence of antifungal

drug resistance: perspectives from the bench and the bedside. **Future Microbiology**, v. 13, p. 1175-1191, 2018.

Bentubo HD, Gompertz OF. Effects of temperature and incubation time on the in vitro expression of proteases, phospholipases, lipases and DNases by different species of *Trichosporon*. **Springerplus**. v.3; p.377, 2014.

Berkow EL, Aangulo D, Lockhart SR. In vitro activity of a novel glucan synthase inhibitor, SCY-078, against clinical isolates of *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.61, 2017.

Biernasiuk A, Baj T, Malm A. Clove Essential Oil and Its Main Constituent, Eugenol, as Potential Natural Antifungals against *Candida spp.* Alone or in Combination with Other Antimycotics Due to Synergistic Interactions. **Molecules**, 2023.

Borman AM, Szekely A, Johson EM. Comparative Pathogenicity of United Kingdom Isolates of the Emerging Pathogen *Candida auris* and Other Key Pathogenic *Candida* Species. **mSphere**, v. 18, 2016.

Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, 72(1–2), 248–254.

Braga PC, Sasso MDAL, Culici M, Alfieri M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 396-400, 2007.

Bustolin AA, Ramos-Milaré ACFH, De Mello TFP, Aristides SMA, Lonardoni MVC, Silveira TGV. In vitro activity of cinnamaldehyde on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Experimental Parasitology**, 2022.

Buakaew W, Sranujit RP, Noysang C, Krobthong S, Yingchutrakul Y, Thongsri Y, Potup P, Daowtak K, Usuwanthim K. Proteomic Analysis Reveals Proteins Involved in the Mode of Action of β -Citronellol Identified From *Citrus hystrix* DC. Leaf Against *Candida albicans*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

Cadnum JL, Shaik AA, Piedrahita T, Sankar T, Jencson AL, Larkin EL, Ghannoum MA, Donskey CJ. Effectiveness of Disinfectants Against *Candida auris* and Other *Candida* Species. **Infection Control and Hospital Epidemiology**, 2017.

Carvalho PC, Lima DB, Leprevost FV, et al. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. **Nature protocols**, v.11, p. 102-117, 2016.

Centers For Disease Control And Prevention. CDC. *Candida auris*. Antifungal Susceptibility Testing and Interpretation 2020. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/c-auris-antifungal.html>>. Acesso em 18 de outubro de 2023.

Centers For Disease Control And Prevention (CDC). Recommendations for identification of *Candida auris*. 13 nov. 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/fungal/candida-auris/candida-auris-qanda.html>>. Acesso em 12 de outubro de 2023.

Cesur S, Ilhan E, Tut TA, Kaya E, Dalbayrak B, Bosgelmez-Tinaz G, Arisan ED, Gunduz O, Kijenska-Gawronska. Design of Cinnamaldehyde- and Gentamicin-Loaded Double-Layer Corneal Nanofiber Patches with Antibiofilm and Antimicrobial Effects. **ACS Omega**, 2023.

Chaabane F, Graf A, Jequier L, Coste AT. Review on Antifungal Resistance Mechanisms in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

Cheng CH, Tu YY, Lin JC. Studies of Mercaptosuccinic Acid-Crosslinked Chitosan Hydrogel with Grafted Cinnamaldehyde and Silver Nanoparticles for Antibacterial Biomedical Application. **International Journal of Molecular Sciences**, 2022.

Chong J, Soufan O, Li C, Caraus, A, Li s, Bourque G, Wishart DS, Xia J. MetaboAnalyst 4.0: Towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 46, p. 486–494, 2014.

Chow NA, Munoz JF, Gade L, Berkow EL, Li X, Welsh RM, Forsberg K, Lockhart SR, Adam R, Alanio A, Alaustrey-Izquierdo A, Althawadi S, Araújo AB, Ben-Ami R, Bharat A, Calvo B, Desons-Ollivier M, Escandón P, Gardam D, Gunturu R, Heath CH, Kurzai O, Martin R, Litvinseva A, Cuomo AC. Tracing the Evolutionary History and Global Expansion of *Candida auris* Using Population Genomic Analyses. **mBio**, v. 28, 2020.

Chowdhary A, Sharma C, Meis JF. *Candida auris*: a rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, 2017.

Chowdhary, A, Prakash A, Sharma C, Kordalewskis M, Kumar A, Sarma S. et al. A multicentre study of antifungal susceptibility patterns among 350 *Candida auris* isolates (2009–17) in India: role of the *ERG11* and *FKS1* genes in azole and echinocandin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 73, p. 891-899, 2018.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2015.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts. 4th ed. CLSI standard M27. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**; 2017.

CLSI. AST News update June 2022: hot topic *Candida auris* update: method variability with amphotericin B susceptibility testing. Disponível em: <<https://clsi.org/about/bog/ast-news-update-june-2022-hot-topic/>>. Acesso em 18 de outubro de 2023.

Cordeiro RA, Serpa R, Mendes PBL, Evangelista AJJ, Andrade ARC, *et al.* The HIV aspartyl protease inhibitor ritonavir impairs planktonic growth, biofilm formation and proteolytic activity in *Trichosporon* spp. **Biofouling**, v. 33, n. 7, 2017.

Cortegiani A, Misseri G, Fasciana T, Giammanco A, Giarranto A, Chowdhary A. Epidemiology, clinical characteristics, resistance and treatment of *Candida auris*. **Journal of Intensive Care**, v. 6, 2018.

De Almeida JN, Jr, Francisco EC, Hagen F, Brandão IB, Pereira FM, Presta Dias, PH, De Miranda Costa MM, De Souza Jordão RT, De Groot T, Colombo AL. Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 Intensive Care Unit. **Journal of Fungi**, v. 7 2021a.

De Almeida JN, JR, Brandão IB, Francisco EC, Almeida SLR, Dias PO, Pereira FM, Ferreira FS, Andrade TS, Costa MMM, Jordão RTS, Meis JF, Colombo AL. Axillary Digital Thermometers uplifted a multidrug-susceptible *Candida auris* outbreak among COVID-19 patients in Brazil. **Mycoses**, v. 64, p. 1062-1072, 2021b.

De Moraes DC. Current scenario of the search for new antifungal agents to treat *Candida auris* infections: An integrative review. **Journal of Medical Mycology**, v. 32, 2022.

Deshkar S, Patil N, Amberkar S, Lad A, Siddiqui F, Sharan S. Identification and Antifungal Drug Susceptibility Pattern of *Candida auris* in India. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 14, p. 131-165, 2022

De Paula SB, Bartelli TF, Raimo V, Santos JP, Morey AT, Bosini MA, Nakamura CV, Yamauchi LM, Yamada-Ogatta SM. Effect of Eugenol on Cell Surface Hydrophobicity, Adhesion, and Biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* Isolated from Oral Cavity of HIV-Infected Patients. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

Di Vito M, Garzoli S, Rosato R, Mariotti M, Gervasoni J, Santucci L, Ovidi E, Cacaci M, Lombarini G, Torelli R, Urbani A, Sanguinetti M, Bugli F. A New Potential Resource in the Fight against *Candida auris*: the *Cinnamomum zeylanicum* Essential Oil in Synergy with Antifungal Drug. **Microbiology Spectrum**, v. 11, 2023.

Didehdar M, Chegini Z, Shariati A. Eugenol: A novel therapeutic agent for the inhibition of *Candida species* infection. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 2022.

Dornelas-Ribeiro M, Pinheiro EO, Guerra C, Braga-Silva LA, Carvalho SMF, Santos ALS, Rozental S, Fracalanza SEL. Cellular characterisation of *Candida tropicalis* presenting fluconazole-related trailing growth. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2017.

Du H, Bing J, Hu T, Ennis CL, Nobile CJ, Huang G. *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. **PLoS Pathogens**. 2020; 16(10): 1-18.

Escandón P. Novel Environmental Niches for *Candida auris*: Isolation from a Coastal Habitat in Colombia. **Journal of Fungi**, v. 19, 2022.

EUCAST- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Método para determinação de concentração inibitória mínima em caldo dos agentes antifúngicos para leveduras, 2020.

Eyre DW, Sheppard AE, Madder H, Moir I, Moroney R, Quan TP, Griffiths D, George S, Butcher L, Morgan M, Newnham R.; Sunderland M, Clarke T, Forter D, Hoffman P, Borman AM, Johnson E, Morre G, Brown CS, Walker AS, Peto TEA, Crook DW, Jeffery KJM. A *Candida auris* Outbreak and Its Control in an Intensive Care Setting. **The New England Journal of Medicine**, v. 379, p. 1322-1331, 2018.

Feng J, Sun L, Zhai T, Liang Q, Jiang T, Chen Z. Preparation of cinnamaldehyde nanoemulsions: Formula optimization, antifungal activity, leaf adhesion, and safety assessment. **Industrial Crops and Products**, 2023.

Forsberg K, Woodworth K, Walters M, Berkow EL, Jackson B, Chiller T. *et al.* *Candida auris*: the recent emergence of a multidrug-resistant fungal pathogen. **Medical Mycology**, v. 57, n. 1, p. 1-12, 2019.

Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, De Andrade SF. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. **Applied Microbiology**, v.66, n.1, p. 2-13, 2017.

Fuentes C, Ruiz-Rico M, Fuentes A, Barat JM, Ruíz MJ. Comparative cytotoxic study of silica materials functionalised with essential oil components in HepG2 cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 147, 2021.

Gabriela N, Rosa AM, Catiana ZI, Soledad C, Mabel OR, Esteban SJ, Veronica B. Daniel W, Ines IM. The Effect of *Zuccagnia punctata*, an Argentine Medicinal Plant, on Virulence Factors from *Candida* Species. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 933-936, 2014.

Gao X, Liu Q, Qing H, Mu K, Zhang J, Zhang D, Li H, Mao S. Development of eugenol-loaded submicron emulsion and its antiepileptic effect through regulating the oxidative stress. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 587, 2020.

Ganic T, Vuletic S, Nikolic B, Stevanovic M, Kuzmanovic M, Kekic D, Durovic S, Cvetkovic S, Mitic-Culafic D. Cinnamon essential oil and its emulsion as efficient antibiofilm agents to combat *Acinetobacter baumannii*. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

Garcia-Bustos V, Cabanero-Navalon MD, Ruiz-Saurí A, Ruiz-Gaitán AC, Salavert M, Tormo MA, Pemán J. What Do We Know about *Candida auris*? State of the Art, Knowledge Gaps and Future Directions. **Microorganisms**, v.10, 2021.

Gautam P, Mushahary D, Hassan W, Upadhyay SK, Madan T, Sirdeshmukh R, Sundaram CS, Sarma PU. In-depth 2-DE reference map of *Aspergillus fumigatus* and its proteomic profiling on exposure to itraconazole. **Medical Mycology**, v. 54, p. 524-536, 2016.

Gow NAR, Johnson C, Berman J, Coste AT, Cuomo CA, Perlin DS, Bicanic T, Harrison TS, Wiederhold N, Bromley M, Chiller T, Edgar K. The importance of antimicrobial resistance in medical mycology. **Nature Communications**, v. 13, 2022.

Gundel SS, Reis TR, Copetti PM, Favarin FR, Sagrillo MR, Silva AS, Segat JC, Baretta D, Ourique AF. Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and ecotoxicity of nanoemulsions containing Mancozeb and Eugenol. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 169, 2019.

Gupta P, Gupta S, Sharma M, Kumar N, Pruthi V, Poluri KM. Effectiveness of Phytoactive Molecules on Transcriptional Expression, Biofilm Matrix, and Cell Wall Components of *Candida glabrata* and Its Clinical Isolates. **ACS Omega**, 2018.

Hata DJ, Humphries R, Lockhart SR. College of American Pathologists Microbiology Committee. *Candida auris*: An Emerging Yeast Pathogen Posing Distinct Challenges for Laboratory Diagnostics, Treatment, and Infection Prevention. **Archives Pathology Laboratory Medicine**, v. 144, p. 107-114, 2020.

He M, Du M, Fan M, Bian Z. In vitro activity of eugenol against *Candida albicans* biofilms. **Mycopathologia**, v. 163, p. 137-143, 2007.

Hoehamer CF, Cummings ED, Hilliard GM, Rogers PD. Changes in the Proteome of *Candida albicans* in Response to Azole, Polyene, and Echinocandin Antifungal Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, p. 1655-1664, 2010.

Houst J, Spizek J, Havlicek V. Antifungal Drugs. **Metabolites**, v. 10, 2020.

Identificação de caso de risco de *Candida auris* no Brasil. **Ministério da Saúde**, 2022. Disponível em: ><https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2020/identificacao-de-possivel-caso-de-candida-auris-no-brasil>> Acesso em 20 de setembro de 2023.

Islamuddin M, Chouhan G, Want MY, Ozbak, Hemeg HA, Afrin F. Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in Experimental Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2016.

Jafri H, Khan MSA, Ahmad I. In vitro efficacy of eugenol in inhibiting single and mixed-biofilms of drug-resistant strains of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, 2019.

Jianhua W, Hai W. Antifungal susceptibility analysis of berberine, baicalin, eugenol and curcumin on *Candida albicans*. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v. 24, p. 132-147, 2009.

Jin Y, Yip HK, Samaranayake YH, Yau JY, Samaranayake LP. Biofilmforming ability of *Candida albicans* is unlikely to contribute to high levels of oral yeast carriage in cases of human immunodeficiency virus infection. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, n. 7, p. 2961-2967, 2003.

Ju J, Xie Y, Yu H, Guo Y, Cheng Y, Qian H, Yao W. Analysis of the synergistic antifungal mechanism of eugenol and citral. **Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie**, v. 123, 2020.

Kamatou GP, Vermaak I, Viljoen AM. Eugenol- From the Remote Maluku Islands to the International Market Place: A review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, p. 6953-6981, 2012.

Kar A, Jayaraman A, Raja MRC, Srinivasan S, Debnath J, Mahapatra SK. Synergic effect of eugenol oleate with amphotericin B augments anti-leishmanial immune response in experimental visceral leishmaniasis in vitro and in vivo. **International Immunopharmacology**, v. 91, 2021.

Karpinski TM, Ozarowski M, Seremak-Mrozikiewicz A, Wolski H, Adamczak A. Plant Preparations and Compounds with Activities against Biofilms Formed by *Candida spp.* **Journal of Fungi**, v. 7, 2021.

Kathuria S, Singh PK, Sharma C, Prakash A, Masih A, Kumar A, Meis JF, Chowdhary A. Multidrug-Resistant *Candida auris* Misidentified as *Candida haemulonni*: Characterization by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry and DNA

Sequencing and Its Antifungal Susceptibility Profile Variability by Vitek2, CLSI Broth Microdilution, and Etes Method. **Journal of Clinical Microbiology**. V. 6, 2015.

Kean R, Sherry L, Townsend E, Mckloud E, Short B, Akinbobola A, Mackay WG, Williams C, Jones BL, Ramage G. Surface disinfection challenges for *Candida auris*: an in vitro study. **Journal of Hospital Infection**, v. 98, p. 433-436, 2018.

Kean R, Ramage G. Combined Antifungal Resistance and Biofilm Tolerance: The Global Threat of *Candida auris*. **mSphere**, v. 4, 2019.

Khadke SK, Lee JH, Kim YG, Raj V, Lee J. Appraisal of Cinnamaldehyde Analogs as Dual-Acting Antibiofilm and Anthelmintic Agents. **Frontiers in Microbiology**, v. 13, 2022.

Khan Z, Ahmad S. *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen of global significance. **Current Medicine Research and Practice**, v. 6, p. 240-248, 2017.

Khan SN, Khan S, Misba L, Sharief M, Hashimi A, Khan AU. Synergistic fungicidal activity with low doses of eugenol and amphotericin B against *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 528, p. 459-464, 2019.

Kim MN, Shin JH, Sung H, Lee K, Kim EC, RN Lee JL, Jung SI, Park KH, Kee SJ, Kim SH, Shin MG, Suh SP, Ryang DW. *Candida haemulonii* and Closely Species at 5 University Hospitals in Korea: Identification, Antifungal Susceptibility and Clinical Features. **Clinical Infectious Diseases**, v. 48, p. 55-61, 2009.

Kim HR, Eom YB. Antifungal and anti-biofilm effects of 6-shogaol against *Candida auris*. **Journal of Applied Microbiology**, 2020.

Kordalewska M, Lee A, Park S, Berio I, Chowdhary A, Zhao Y, Perli DS. Understanding Echinocandin Resistance in the Emerging Pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, 2018.

Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal Susceptibility of *Candida* Biofilms: Unique Efficacy of Amphotericin B Lipid Formulations and Echinocandins. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, 2002.

Lara-Aguillar V, Rueda C, García-Barbazán I, Varona S, Monzón S, Jiménez P, Cuesta I, Zaballos A, Zaragoza O. Adaptation of the emerging pathogenic yeast *Candida auris* to high caspofungin concentrations correlates with cell wall changes. **Virulence**, v. 12, p. 1400-1417, 2021.

Ledwoch K, Maillard J. *Candida auris* Dry Surface Biofilm (DSB) for Disinfectant Efficacy Testing. **Materials**, 2019.

Lee WG, Shin JH, Uh Y, Kang MG, Kim SH, Park KW, Jang HC. First Three Reported Cases

of Nosocomial Fungemia Caused by *Candida auris*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n.9, p. 3139-3142, 2011.

Li X, Yan Z, Xu J. Quantitative variation of biofilms among strains in natural populations of *Candida albicans*. **Microbiology**, v. 149, p. 353-362, 2003.

Lim D, Lim KH, Kang E, Lim SE, Ricci J, Sung SK, Kwon MT, Jeong SH. comprehensive evaluation of carboxylated nanodiamond as a topical drug delivery system. **International Journal of Nanomedicine**, 2016.

Liu J, Li Q, Wang C, Shao J, Wang T, W D, Ma K, Yan G, Yin D. Antifungal evaluation of traditional herbal monomers and their potential for inducing cell wall remodeling in *Candida albicans* and *Candida auris*. **Biofouling**. v. 36, n. 3, p. 319-331, 2020.

Lockhart SR. *Candida auris* and multidrug resistance: Defining the new normal. **Fungal Genetics and Biology**, v. 131, 2019.

Lockhart SR, Etienne KA, Vallabhaneni S. et al. Simultaneous emergence of multidrug-resistant *Candida auris* on 3 continents confirmed by wholegenome sequencing and epidemiological analyses. **Clinical Infectious Diseases**, v. 22, 2022.

Lone SA, Wani MY, Fru P, Ahmad A. cellular apoptosis and necrosis as therapeutic targets for novel eugenol tosylate congeners against *Candida albicans*. **Scientific Reports**, 2020.

Lopachin RM, Gavin T. Molecular Mechanisms of Aldehyde Toxicity: A Chemical Perspective. **Chemical Research in Toxicology**, 2014.

Lopes AA, Fonseca FN, Rocha TM, Freitas LB, Araújo EVO, Wong DVT, Júnior RCPM, Leal LKAM. Eugenol as a Promising Molecule for the Treatment of Dermatitis: Antioxidant and Anti-inflammatory Activities and Its Nanoformulation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2018.

Maurice MN, Huseein EAM, Monib MEMM, Alsharifi FM, Namazi NI, Ahmad AA. Evaluation of the scolicidal activities of eugenol essential oil and its nanoemulsion against protoscoleces of hydatid cysts. **PLoS one**, 2021.

Marchese A, Barbieri R, Corpo E, Orhan IE, Daglia M, Izadi M, Abdollahi M, Nabavi SM, Ajami M. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, 2017.

Miranda-Cadena K, Marcos-Arias C, Mateo E, Aguirre-Urizar JM, Quindós G, Eraso E. In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida biofilms*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.143, 2021(a).

Miranda-Cadena K, Dias M, Costa-Barosa, Collins T, Marcos-Arias C, Eraso, Elena, Pais C, Quindós G, Sampaio P. Development and Characterization of Monoolein-Based Liposomes of Carvacrol, Cinnamaldehyde, Citral or Thymol with Anti-*Candida* Activities. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 65, 2021(b).

Moraes DC. Current scenario of the search for new antifungal agents to treat *Candida auris* infections: An integrative review. **Journal of Medical Micology**, v. 32, 2022.

Mosmann T. Rapid Colrimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1986.

Muñoz JF, Welsh RM, Shea T, Batra D, Gade L, et al. 2021. Clade-specific chromosomal rearrangements and loss of subtelomeric adhesins in *Candida auris*. **Genetics**, 2021.

Muthamil S, Prasath KG, Priya A, Precilla P, Pandian SK. Global proteomic analysis deciphers the mechanism of action of plant derived oleic acid against *Candida albicans* virulence and biofilm formation. **Scientific Reports**, v. 10, 2020.

Neto JBA, Silva CR, Campos RS. et al., 2018. Action mechanism of naphthofuranquinones against fluconazole-resistant *Candida tropicalis* strains evidenced by proteomic analysis: The role of increased endogenous ROS. **Microbial Pathogenesis**, v. 117, p. 32-42.

Padovan ACB, Rocha WPDS, Toti ACM, Freitas De Jesus DF, Chaves GM, Colombo AL. Exploring the resistance mechanisms in *Trichosporon asahii*: Triazoles as the last defense for invasive trichosporonosis. **Fungal Genetics and Biology**. v.133, 103267, 2019.

Patra JK, Das G, Fraceto LF, Campos EVR, Rodriguez-Torres MP, Acosta-Torres LSL, Diaz-Torres LA, Grillo R, Swamy MK, Sharma S, Habtemariam S, Shin H. Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects. **Journal of Nanotechnology**, 2018.

Panjaitan CC, Widyarman AS, Astoeti TE. Antimicrobial and Antibiofilm Activity of Cinnamon (*Cinnamomum burmani*) Extract on Periodontal Pathogens—An in vitro study. **European Journal of Dentistry**, v. 16, 2022.

Pereira WA, Pereira CDS, Assunção RG, Silva ISC, Rego FS, Alves LSR, Santos JS, Nogueira FJR, Zagmignan A, Thomsen TT, Lobner-Olesen A, Krogfelt KA, Silva LCN Abreu AG. New Insights into the Antimicrobial Action of Cinnamaldehyde towards *Escherichia coli* and Its Effects on Intestinal Colonization of Mice. **Biomolecules**, 2021.

Piatek M, O’Beirne C, Beato Z, Tacke M, Kavanagh K. Exposure of *Candida parapsilosis* to the silver(I) compound SBC3 induces alterations in the proteome and reduced virulence. **Metalomics**, v. 14, 2022.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL, Jr Mowat E, Ramage G, Lopez-Ribot JL. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature protocols**, v. 3, p. 1494–1500, 2008.

Polaquini CR, Torrezan GS, Santos VR, Nazaré AC, Campos DL, Almeida LA, Silva IC, Ferreira H, Pavan FR, Duque C, Regasini LO. Antibacterial and Antitubercular Activities of Cinnamylideneacetophenones. **Molecules**, v. 22, 2017.

Poulsen JS, Madsen AM, White JK, Nielsen JL. Physiological Responses of *Aspergillus niger* Challenged with Itraconazole. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, 2021.

Prajapati J, Rao P, Poojara L, Acharya D, Patel SK, Goswami D.; RAWAL, R.M. A Comprehensive in vitro and in silico Assessment on Inhibition of CYP51B and Ergosterol Biosynthesis by Eugenol in *Rhizopus oryzae*. **Springer Nature - PMC COVID-19 Collection**, v. 80, 2023.

Prasath KG, Sethupathy S, Pandian SK. Proteomic analysis uncovers the modulation of ergosterol, sphingolipid and oxidative stress pathway by myristic acid impeding biofilm and virulence in *Candida albicans*. **Journal of Proteomics**, v. 208, 2019.

Qian W, Sun Z.; WANG, TIN.; YANG, M.; LIU, M.; ZHANG, J.; LI, Y. Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effects on biofilms.

Microbial Pathogenesis, v. 139, 2020.

Rangel ML, Aquino SG, Lima JM, Castellano LR, Castro RD. In Vitro Effect of Cinnamomum zeylanicum Blume Essential Oil on *Candida spp.* Involved in Oral Infections. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

Rajendran R, Sherry L, Nile CL, Sherriff A, Johson EM, Hanson MF, Williams C, Munro CA, Jones BJ, Ramage G. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, p. 87-93, 2012.

Ranjitkar S, Zhang D, Sun F, Salman S, He W, Venkitanarayana K, Tulman ER, Tian X. Cytotoxic effects on cancerous and non-cancerous cells of *trans*-cinnamaldehyde, carvacrol, and eugenol. **Scientific Reposrts**, v. 11, 2021.

Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Kaeuppayil SM. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. **Biofouling: The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research**, 2012.

Rhodes J, Abdolrasouli A, Farrer RA, Cuomo CA, Aanensen DM, Aamostrong-James D, Fisher MC, Schelens S. Genomic epidemiology of the UK outbreak of the emerging humam fungal pathogen *Candida auris*. **Emerging Microbes and Infections**, v. 7, 2018.

Rosenberg A, Ene JV, Bibi M, Zakin S, Segak SE, Ziv N, Dahan AM, Colombo AL, Bennett RJ, Berman J. Antifungal tolerance is a subpopulation effect distinct from resistance and is associated with persistent candidemia. **Nature Communications**, 2018.

Rueda C, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O. Paradoxical Growth of *Candida albicans* in the Presence of Caspofungin Is Associated with Multiple Cell Wall Rearrangements and Decreased Virulence. **Antimicrobial Agents and Chemoterapy**, v. 58, 2014.

Ruiz GB, Lorenz A. What do we know about the biology of the emerging fungal pathogen of humans *Candida auris*? **Microbiological Researcher**, 2020.

Ruiz-Gaitán AC, Cantón E, Fernández-Rivero ME, Ramírez P, Pemán J. Outbreak of *Candida auris* in Spain: A comparison of antifungal activity by three methods with published data. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 53, p. 541-546, 2019.

Saracino IM, Foschi C, Pavoni M, Spigarelli R, Valerii MC, Spisni E. Antifungal Activity of Natural Compounds vs. *Candida spp.*: A Mixture of Cinnamaldehyde and Eugenol Shows Promising In Vitro Results. **Antibiotics**, 2022.

Sardi JCOC, Silva DR, Mendes-Giannini MJS, Rosalen PL. *Candida auris*: Epidemiology, risk factors, virulence, resistance, and therapeutic options. **Microbial Pathogenesis**, 2018.

Satoh K, Makimura K, Hasumi Y, Nishiyama Y, Uchida K, Yamaguchi H. *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41-44, 2009.

Sawicki R, Golus J, Przekora A, Ludwiczuk A, Sieniawksa E, Ginalksa G. Antimycobacterial Activity of Cinnamaldehyde in a *Mycobacterium tuberculosis* (H37Ra) Model. **Molecules**, 2018.

Sayeed MA, Farooqi J, Jabeen K, Mahmood SF. Comparison of risk factors and outcomes of *Candida auris* candidemia with non-*Candida auris* candidemia: A retrospective study from Pakistan. **Medical Mycology**, 2020.

Schelenz S. et al. First hospital outbreak of the globally emerging *Candida auris* in a European hospital. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, v. 5, p. 35, 2016.

Sears D, Schwartz BS. *Candida auris*: An emerging multidrug-resistant pathogen. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 63, p. 95-98, 2017.

Shaban S, Patel M, Ahmed A. Improved efficacy of antifungal drugs in combination with monoterpene phenols against *Candida auris*. **Scientific reports**, v. 10, 2020.

Shahabadi N, Akbari A, Karampour F, Falsafi M. Cytotoxicity and antibacterial activities of new chemically synthesized magnetic nanoparticles containing eugenol. **Journal of Drug Delivery Science and Techonolgy**, v.49, 2019.

Sharifzadeh A, Shokri H. In vitro synergy of eugenol on the antifungal effects of voriconazole against *Candida tropicalis* and *Candida krusei* strains isolated from the genital tract of mares. **Equine Veterinary Journal**, 2020.

Shahina Z, Ndlovu E, Persaud O, Sultana T, Dahms TES. *Candida albicans* Reactive Oxygen Species (ROS)-Dependent Lethality and ROS-Independent Hyphal and Biofilm Inhibition by Eugenol and Citral. **Microbiology Spectrum**, v. 10, 2022.

Sharma G, Raturi K, Dang S, Gupta S, Gabrani S. Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Herbal Medicine**, v.9, p. 68-73, 2017.

Shelton JMG, Collins R, Uzzell CB, Alghamdi A, Dyer PS, Singer AC, Fisher MC. Citizen Science Surveillance of Triazole-Resistant *Aspergillus fumigatus* in United Kingdom Residential Garden Soils. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 88, 2022.

Sherry L, Ramage G, Kean R, Borman A, Johsson EM, Richardson MD, Rautemaa-Richardson R. Biofilm-Forming Capability of Highly Virulent, Multidrug-Resistant *Candida auris*. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, 2017.

Shreaz S, Bathia R, Khan N, Muralidhar S, Basir SF, Manzoor N, Khan LA. Spruce oil cinnamaldehyde exhibits potent anticandidal activity against fluconazole resistant clinical isolates. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1012-1020, 2011.

Shreaz S, Wani WA, Behbehani JM, Raja V, Irshad M, Karched M, Ali I, Siddiqi WA, Hun LT. Cinnamaldehyde and its derivatives, a novel class of antifungal agents. **Fitoterapia**, v. 112, p. 116-131, 2016.

Silva AL, Bezerra LP, Freitas CDT. et al., 2022. *Luffa operculata* seed proteins: Identification by LC-ESI-MS/MS and biotechnological potential against *Candida albicans* and *C. krusei*. **Analytical Biochemistry**, v. 655.

Soll DR, Daniels KJ. Plasticity of *Candida albicans* Biofilms. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 80, p. 565-595, 2016.

Song N, Zhou X, Li D, Li X, Liu W. A Proteomic Landscape of *Candida albicans* in the Stepwise Evolution to Fluconazole Resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, 2022.

Spivak ES, Hanson KE. *Candida auris*: an Emerging Fungal Pathogen. **Journal of Clinical Microbiology**, 2018.

Spruijtenburg B, Badali H, Abastabar M, Mirhendi H, KhoDdavaissy S, Sharifisooraki J, Taghizadeh Armaki M, De Groot T, Meis JF. Confirmation of fifth *Candida auris* clade by whole genome sequencing. **Emerging Microbes and Infections**, v. 11, p. 2405-2411, 2022.

Stevens DA, Espiritu M, Parmar R. Paradoxical Effect of Caspofungin: Reduced Activity against *Candida albicans* at High Drug Concentrations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, 2004.

Stevens DA, Ichinomiya M, Koshi Y, Horiuchi H. Escape of *Candida* from caspofungin inhibition at concentrations above the MIC (paradoxical effect) accomplished by increased cell wall chitin; evidence for beta-1,6-glucan synthesis inhibition by caspofungin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, 2006.

Sun W, Wang D, Yu C, Huang X, Li X, Sun S. Strong synergism of dexamethasone in

combination with fluconazole against resistant *Candida albicans* mediated by inhibiting drug efflux and reducing virulence. **Journal of Antimicrobial Agents**, v. 50, p. 399-405, 2017.

Szweda P, Guewa K, Kurzyk E, et al. Essential Oils, Silver Nanoparticles and Propolis as Alternative Agents Against Fluconazole Resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* Clinical Isolates. **Indian Journal of Microbiology**, v. 55, p. 175-183, 2015.

Teles AM, Silva-Silva JV, Fernandes JMP, Abreu-Silva AN, Calabrese KS, Filho NEM, Moushrek AN, Almeida-Souza F. GC-MS Characterization of Antibacterial, Antioxidant, and Antitrypanosomal Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil and Eugenol. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2021.

Thirapanmethee K, Kanathun P, Khuntayaporn P, Huayhongthong S, Surassmo S, Chomnawang MT. Cinnamaldehydhe: A plant-derived antimicrobial for overcoming multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* infection. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 48, 2021.

Tsay S, Kallen A, Jackson BR, Chiller TM, Vallabhaneni S. Approach to the Investigation and Management of Patients with *Candida auris*, an Emerging Multidrug-Resistant Yeast. **Clinical Infectious Diseases**, v. 66, p. 306-311, 2018.

Wani MY, Ahmad A, Aqlan FM, Al-Bogami AS. Modulation of key antioxidant enzymes and cell cycle arrest as a possible antifungal mode of action of cinnamaldehyde based azole derivative. **Bioorganic e Medicinal Chemistry Letters**, v. 1, 2022.

Watkins RR, Gowen R, Lionakis MS, Ghannoum M. Update on the Pathogenesis, Virulence, and Treatment of *Candida auris*. **Pathogens and Immunity**, v. 7, p. 46-65, 2022.

Welsh RM, Bentz ML, Shams A, Houston H, Lyons A, Rose LJ, Litvintseva AP. Survival, Persistence, and Isolation of the Emerging Multidrug-Resistant Pathogenic Yeast *Candida auris* on a Plastic Health Care Surface. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 55, p. 2996-3005, 2017.

Wijesinghe GK, Maia FC, Oliveira TR, Feiria SNB, Joia F, Barbosa JP, Boni GC, Sardi JCO, Rosalen PL, Hofling JF. Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the in-vivo toxicity with *Galleria mellonella* model. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, 2020.

Yadav A, Jain K, Wang Y, Pawar K, Kaur H, Sharma KK, Tripathy V, Singh A, Xu J, Chowdhary A. *Candida auris* on Apples: Diversity and Clinical Significance. **mBio**, v. 13, 2022.

Ye W, Chen Y, Zhang W, Liu T, Liu Y, Li M, Li S, Xu L, Liu H. Potential Anti-*Candida albicans* Mechanism of Trichoderma Acid from Trichoderma spirale. **Molecular Sciences**, v. 46, 2023.

Zhang J, Liu L, He Y, Kong W, Huang S. Cytotoxic effect of trans-cinnamaldehyde on human leukemia K562 cells. **Acta Pharmacologia Sinica**, 2010.