



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação Farmácia-Bioquímica

LETICIA SAYURI OGASAWARA

AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA E SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DE
PRODUTOS NATURAIS E SUAS ASSOCIAÇÕES COM FLUCONAZOL NO
TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *CANDIDA GLABRATA* E *CANDIDA*
TROPICALIS

Araraquara (SP)

2024

LETICIA SAYURI OGASAWARA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA E SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DE
PRODUTOS NATURAIS E SUAS ASSOCIAÇÕES COM FLUCONAZOL NO
TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *CANDIDA GLABRATA* E *CANDIDA
TROPICALIS***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Farmácia Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, para obtenção do grau de Farmacêutica Bioquímica.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almeida

Coorientadora: Dra. Lígia de Souza Fernandes

Araraquara (SP)

2024

O34a

Ogasawara, Leticia Sayuri.

Avaliação da eficácia terapêutica e segurança toxicológica de produtos naturais e suas associações com fluconazol no tratamento de infecções por *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* / Leticia Sayuri Ogasawara. – Araraquara, 2024.

33 f. : il.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação – Farmácia Bioquímica) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Ana Marisa Fusco Almeida.

Coorientadora: Lígia de Souza Fernandes.

1. *Candida sp.* 2. SARS-CoV-2. 3. Coinfecção. 4. *Rosmarinus officinalis*. 5. Fluconazol. I. Almeida, Ana Marisa Fusco, orient. II. Fernandes, Lígia de Souza, coorient. III. Título.

LETICIA SAYURI OGASAWARA

**AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA TERAPÊUTICA E
SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS E SUAS
ASSOCIAÇÕES COM FLUCONAZOL NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR
CANDIDA GLABRATA E CANDIDA TROPICALIS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, para obtenção do título de Bacharela em Farmácia Bioquímica.

Área de Concentração: N/A

Data da defesa: 27/05/2024

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Ana Marisa Fusco Almenida
UNESP – Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Campus de Araraquara

Profa. Dra. Ana Karla Lima Freire Cabral
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof. Dr. Leonardo Miziara Barboza Ferreira
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Dra. Kaila Petronila Medina Alarcón da Silva
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Prof Dr. Andrei Moroz
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, por todo o apoio durante toda a minha trajetória na graduação. Seu incentivo e compreensão foram essenciais para enfrentar os desafios e alcançar este marco em minha jornada acadêmica.

Aos meus amigos, que contribuíram de maneira única para tornar essa jornada ainda mais significativa e especial. Seja pelos estudos em grupo, pelas risadas, pelas conversas que aliviaram momentos de tensão, cada gesto foi apreciado.

Aos meus colegas professores, em especial minhas orientadoras Ana Marisa Fusco Almeida e Lúgia de Souza Fernandes, que tanto me ensinaram e confiaram em meu potencial. Seu compromisso com a excelência acadêmica motivou-me a superar desafios e me deram condições para atingir meus objetivos.

Ao Núcleo de Proteômica, pela oportunidade de realizar minha iniciação científica, disponibilizar toda a infraestrutura e os recursos essenciais para a realização dos experimentos e análises.

Aos meus colegas do laboratório, em especial a Kaila Medina-Alarcón e o Kelvin dos Santos, pela orientação, pelo auxílio e pelas valiosas discussões que enriqueceram o desenvolvimento da pesquisa. E ao Leonardo Rodrigues por tornar possível meus experimentos com o tenébrio ao trazê-los para o laboratório.

Ao Professor Iguatemy Brunetti e sua Mestranda Tainá Lima, do Laboratório de Bioquímica e Enzimologia Clínicas da UNESP, pela gentil doação do padrão de Ácido rosmarínico fundamental para a realização deste trabalho.

Ao CNPq por reconhecer o valor da minha pesquisa e por fornecer o suporte financeiro necessário para a concretização deste projeto.

À Universidade Estadual Paulista, de ensino público, que proporcionou meu desenvolvimento tanto acadêmico quanto individual. Nesta instituição construí muitas lembranças inesquecíveis, conheci pessoas maravilhosas e pude usufruir das mais diversas oportunidades, as quais foram para mim de grande valor.

Por fim, ao meu irmão Henrique, que hoje descansa em paz, demonstrou muita admiração por mim durante minha trajetória acadêmica, o que me motivou a seguir com as minhas atividades na faculdade, me aprimorar e ser para ele um exemplo. Sua falta é profundamente sentida, mas sua presença permanece viva em minhas lembranças e nas lições que aprendi com você. Expresso minha eterna gratidão por tudo o que vivemos juntos.

RESUMO

A candidíase orofaríngea é uma infecção fúngica provocada por diversas espécies de *Candida*, principalmente *C. albicans*. Esses microrganismos são componentes normais da microbiota oral em indivíduos saudáveis. Contudo, em determinadas circunstâncias, podem tornar-se patogênicos. Por muitos anos, a *C. albicans* foi a principal responsável por essa infecção, mas pesquisas recentes indicam um aumento na prevalência de espécies de *Candida* não-*albicans*, como a *C. tropicalis* e *C. glabrata*. Este aumento está relacionado ao perfil de resistência intrínseca dessas espécies aos fármacos azóis e outros fatores. Dados da literatura demonstraram que com a pandemia causada pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2), os pacientes infectados que já apresentavam a saúde debilitada, alguns apresentavam também coinfeções orofaríngeas por espécies de *Candida* não-*albicans* comprometendo ainda mais o quadro do paciente. O fluconazol (FCZ) é um medicamento amplamente utilizado no tratamento destas infecções fúngicas, no entanto, também pode causar efeitos adversos significativos, especialmente em pacientes com um quadro de saúde comprometido. Sendo assim, dado o aumento da prevalência e a resistência de *C. tropicalis* e *C. glabrata* aos medicamentos existentes assim como a toxicidade dos fármacos disponíveis para tratamento, destaca-se a urgência do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas com alta eficácia terapêutica e baixa toxicidade. *Rosmarinus officinalis* é uma erva medicinal comum em produtos farmacêuticos e na medicina tradicional e que contém o ácido rosmarínico (AR), um éster polifenólico com diversas atividades farmacológicas. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica e a toxicidade do extrato seco de *R. officinalis* (ERO), do AR e de suas combinações com FCZ frente à *C. glabrata* e *C. tropicalis*. Na avaliação da atividade antifúngica dos compostos pela técnica de microdiluição em caldo, os resultados obtidos indicaram que esses ativos naturais possuem uma atividade antifúngica significativa, especialmente contra cepas resistentes de *C. glabrata*. As combinações foram submetidas ao ensaio "checkerboard", e a combinação de FCZ com ERO demonstrou interação mais vantajosa frente as demais combinações testadas. Para a avaliação da toxicidade *in vitro*, empregou-se células Vero, e foi observada baixa toxicidade desta combinação. Nos ensaios com o modelo *in vivo* de *Tenebrio molitor*, foi possível fazer a análise de toxicidade e atividade antifúngica ao monitorar a sobrevivência das larvas e carga fúngica, porém são necessárias mais pesquisas com a combinação escolhida neste estudo. Em uma análise global, a combinação de FCZ com ERO destacou-se como a mais promissora, demonstrando eficácia antifúngica significativa sem induzir citotoxicidade relevante.

Palavras-chave: *Candida* sp.; SARS-CoV-2; coinfeção; *Rosmarinus officinalis*; Fluconazol.

ABSTRACT

Oropharyngeal candidiasis is a fungal infection caused by various *Candida* species, primarily *C. albicans*. These microorganisms are normal components of the oral microbiota in healthy individuals. However, under certain circumstances, they can become pathogenic. For many years, *C. albicans* was the main culprit for this infection, but recent research indicates an increase in the prevalence of non-*albicans Candida* species, such as *C. tropicalis* and *C. glabrata*. This increase is linked to the intrinsic resistance profile of these species to azole drugs and other factors. Literature data has shown that during the severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) pandemic, infected patients with compromised health presented oropharyngeal co-infections by non-*albicans Candida* species, further complicating their condition. Fluconazole (FCZ) is a widely used medication for treating these fungal infections; however, it can cause significant adverse effects, especially in patients with compromised health. Therefore, given the increasing prevalence and resistance of *C. tropicalis* and *C. glabrata* to existing medications, as well as the toxicity of available drugs, there is an urgent need for the development of new therapeutic strategies with high efficacy and low toxicity. *Rosmarinus officinalis* is a common medicinal herb in pharmaceutical products and traditional medicine, containing rosmarinic acid (AR), a polyphenolic ester with various pharmacological activities. The objective of this study was to evaluate the antifungal activity and toxicity of the dry extract of *R. officinalis* (ERO), AR, and their combinations with FCZ against *C. glabrata* and *C. tropicalis*. In the assessment of antifungal activity using the broth microdilution technique, the results indicated significant antifungal activity of these natural agents, especially against resistant strains of *C. glabrata*. Combinations were subjected to the “checkerboard” assay, and the FCZ-ERO combination showed a more advantageous interaction than other tested combinations. For *in vitro* toxicity evaluation, Vero cells were employed, and low toxicity of this combination was observed. In assays with the *Tenebrio molitor in vivo* model, toxicity and antifungal activity were analyzed by monitoring larval survival and fungal burden, but further research with the chosen combination in this study is needed. In an overall analysis, the FCZ-ERO combination emerged as the most promising, demonstrating significant antifungal efficacy without inducing relevant cytotoxicity.

Keywords: *Candida* sp.; SARS-CoV-2; co-infection; *Rosmarinus officinalis*; Fluconazole.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Citotoxicidade do fluconazol na linhagem celular Vero. Dados apresentados como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa: $*p < 0,0001$. 20
- Figura 2** - Citotoxicidade do extrato de *Rosmarinus officinalis* na linhagem celular Vero. Dados apresentados como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa: $*p < 0,0001$ 21
- Figura 3** - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* a administração das injeções dos princípios ativos isolados, as combinações e o controle. Diferença estatisticamente significativa: $*p < 0,01$ 24
- Figura 4** - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* após inoculação com 5µL e 10µL de PBS. 25
- Figura 5** - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* após infecção com *C. glabrata* em concentrações de $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ UFC/larva. Diferença estatisticamente significativa: $*p < 0,05$ 25
- Figura 6** - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* após infecção com *C. glabrata* e tratamento com os princípios ativos isoladamente, as combinações e os controles. FCZ 350 µg/mL e PBS foram utilizados como controles de tratamento positivo e negativo, respectivamente. Diferença estatisticamente significativa: $*p < 0,01$ 26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentração dos princípios ativos e combinações administradas em <i>T. molitor</i>	17
Tabela 2 - Concentração dos princípios ativos, combinações e inóculo de <i>C. glabrata</i> administrados em <i>T. molitor</i>	18
Tabela 3 - Resultados das CIM ₈₀ e CFM em µg/mL de FCZ, ERO e AR para <i>C. tropicalis</i> e <i>C. glabrata</i>	19
Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM ₅₀) para a <i>C. glabrata</i> , concentração efetiva 50% (CE ₅₀) e índice de seletividade (IS) do extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i> (ERO) e do fluconazol (FCZ) em linhagem celular Vero.	21
Tabela 5 - Resultados dos menores Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) obtidos na avaliação da atividade antifúngica combinatória, as concentrações dos princípios ativos associados, porcentagem de inibição do crescimento fúngico e tipo de interação frente à <i>C. glabrata</i>	22
Tabela 6 - Porcentagem de viabilidade celular para a concentração correspondente ao menor ICIF obtido em linhagem celular Vero.	23

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AR	Ácido Rosmarínico
AMB	Anfotericina B
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
ATCC	American Type Culture Collection
CE ₅₀	Concentração Efetiva 50
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetil Sulfóxido
ERO	Extrato de <i>Rosmarinus officinalis</i>
FCZ	Fluconazol
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
IS	Índice de Seletividade
PBS	Solução Salina Tamponada com Fosfato
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 OBJETIVO	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1 Microrganismos e condições de crescimento	14
3.1.2 Princípios ativos	14
3.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)	15
3.2 Avaliação da atividade antifúngica combinatória	15
3.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos bioativos em cultura celular	16
3.4 Avaliação de toxicidade de compostos bioativos em modelo animal alternativo (<i>Tenebrio molitor</i>)	17
3.5 Avaliação da eficácia terapêutica em modelo animal alternativo (<i>Tenebrio molitor</i>)....	17
3.5.1 Curva de sobrevivência	18
3.6 Análise estatística.....	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM)	19
4.2 Avaliação da citotoxicidade dos compostos bioativos em cultura celular monocamada	20
4.3 Avaliação da atividade antifúngica combinatória	22
4.4 Avaliação da citotoxicidade da associação do fluconazol com extrato de <i>R. officinalis</i> em cultura celular em monocamada.....	23
4.5 Avaliação da toxicidade em modelo animal alternativo (<i>Tenebrio molitor</i>)	23
4.6 Avaliação da eficácia terapêutica em modelo animal alternativo (<i>Tenebrio molitor</i>)....	24
4.6.1 Padronização das condições experimentais no modelo de infecção	24
4.6.2 Curva de sobrevivência	26
5 CONCLUSÃO	27

6 REFERÊNCIAS.....28

1 INTRODUÇÃO

A candidíase orofaríngea é uma infecção fúngica causada por espécies de *Candida*, como *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. kefyr*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e principalmente *C. albicans* (Silva et al., 2018). Esses microrganismos fazem parte da microbiota oral normal em indivíduos saudáveis. No entanto, vários fatores sistêmicos e locais podem promover o crescimento excessivo, tornando-os patogênicos (Silva et al., 2018). Os sintomas da candidíase orofaríngea incluem irritação mucosa, formação de pseudomembranas e lesões eritematosas (Matsui; Higashide; Hanaki, 2020).

Por muitos anos, a *C. albicans* foi o principal agente causador da candidíase orofaríngea. No entanto, pesquisas recentes revelaram um aumento na prevalência de espécies fúngicas do complexo *Candida* não-*albicans* (Almeida et al., 2021). Espécies como *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* foram identificadas em pacientes. Algumas dessas espécies têm chamado a atenção devido à sua resistência frequente a medicamentos antifúngicos específicos, como o fluconazol (Ademe; Girma, 2020).

O agravamento da candidíase pode levar à candidíase invasiva, uma contribuinte significativa para morbidade e mortalidade em pacientes hospitalizados. A forma mais grave de candidíase invasiva é a candidemia (Ponzio, 2015; Farias; Santos; Damasceno, 2021). Fatores de risco comumente identificados para o desenvolvimento de candidemia em pacientes incluem idade avançada, hospitalização prolongada, uso de antibióticos de amplo espectro, presença de cateter vascular central, dependência de nutrição parenteral, ventilação mecânica, colonização, profilaxia antifúngica, terapia antibiótica prolongada, sepse grave, uso de corticosteroides e quimioterapia (Görkem et al., 2021).

Pacientes em UTI infectados pelo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV-2) têm seu tecido pulmonar comprometido e, portanto, são submetidos à ventilação mecânica, terapia com corticosteroides e antibióticos de amplo espectro, além de permanecerem no ambiente hospitalar por longos períodos (Görkem et al., 2021). O uso de corticosteroides visa diminuir a destruição tecidual, reduzindo a resposta imunológica, e os antibióticos previnem a infecção bacteriana no local lesionado (Görkem et al., 2021). No entanto, essas terapias podem perturbar a

microbiota normal do paciente, criando um desequilíbrio que favorece o crescimento de patógenos fúngicos oportunistas, incluindo *Candida* spp., o que pode levar à candidíase orofaríngea.

Durante a pandemia de SARS-CoV-2, o aumento de pacientes demandando cuidados intensivos cresceu também o risco de infecções fúngicas invasivas, incluindo a candidíase invasiva (Farias; Santos; Damasceno, 2021). A coinfeção de espécies como *C. glabrata* ou *C. tropicalis* em pacientes hospitalizados com o vírus representou um desafio significativo. Essas espécies apresentam uma alta taxa de mortalidade, superando a de *C. albicans*. Esse aumento na mortalidade provavelmente está relacionado à reduzida sensibilidade dessas espécies a certos medicamentos antifúngicos (Silva *et al.*, 2021).

O fluconazol é um medicamento fungistático amplamente utilizado no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas e superficiais (Fluconazole, 2017). No entanto, pode causar efeitos adversos significativos em alguns pacientes, incluindo náuseas, dor abdominal, vômitos, diarreia, dor de cabeça e, embora raramente, hepatotoxicidade, dermatite esfoliativa, anafilaxia, trombocitopenia e leucopenia, mesmo quando administrado em doses terapêuticas (Fica, 2004). Esses efeitos colaterais do fluconazol podem agravar a condição de pacientes já debilitados devido à infecção grave pelo SARS-CoV-2.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, a resistência ao fluconazol é mais comumente observada em espécies não-*albicans* de *Candida*. Seguindo as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), uma espécie de *Candida* é considerada resistente em testes de sensibilidade *in vitro* quando o ponto de corte excede 64 µg/mL (CLSI, 2008).

O uso indiscriminado de fluconazol, especialmente em pacientes imunocomprometidos, tem levado a resultados insatisfatórios no tratamento de infecções fúngicas devido ao surgimento de resistência fúngica. Entre as espécies clínicas de *Candida*, *C. glabrata* apresenta a maior incidência de resistência aos azóis (Domingos *et al.*, 2005; Whaley *et al.*, 2017). Além disso, essa espécie demonstra resistência intrínseca aos antifúngicos, especialmente ao fluconazol (Hassan; Chew; Than, 2021). A *C. tropicalis*, por outro lado, exibe resistência aos azóis e particularmente mais alta ao fluconazol (Zuza-Alves; Silva-Rocha; Chaves, 2017).

A saúde comprometida de pacientes com infecção grave por SARS-CoV-2 e o perfil de resistência de *C. tropicalis* e *C. glabrata* aos medicamentos atualmente

disponíveis destacam a urgência do desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. Essas estratégias devem priorizar baixa toxicidade, potencialmente incorporando ingredientes ativos naturais e terapias antimicrobianas combinadas. Tais abordagens podem ajudar a restaurar a eficácia de medicamentos que perderam sua eficácia devido à resistência fúngica.

A *Rosmarinus officinalis*, uma erva medicinal amplamente reconhecida, é extensivamente utilizada em produtos farmacêuticos e na medicina tradicional. Ela é preferida por sua segurança, acessibilidade e atributos ecologicamente sustentáveis, que a distinguem de substâncias sintéticas (Díass *et al.*, 2021).

Por exemplo, o ácido rosmarínico é um éster polifenólico presente principalmente no extrato etanólico de *R. officinalis*. Ele possui uma ampla gama de propriedades benéficas, incluindo ações antioxidantes, anti-inflamatórias, antiapoptóticas, antitumorais, antialérgicas, antivirais, citoprotetoras, gastroprotetoras e antimicrobianas (Nadeem *et al.*, 2019; Formiga *et al.*, 2021; Kamelabad *et al.*, 2021).

2 OBJETIVO

Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* frente às espécies de *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* e toxicidade *in vitro* do extrato seco de *Rosmarinus officinalis*, do ácido rosmarínico e de suas combinações com o fluconazol.

2.1 Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória mínima do extrato seco de *Rosmarinus officinalis* e do ácido rosmarínico contra *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*;
- Determinar a concentração fungicida mínima do extrato seco de *Rosmarinus officinalis* e do ácido rosmarínico contra *Candida glabrata* e *Candida tropicalis*;
- Avaliar a atividade antifúngica *in vitro* das combinações do extrato seco de *Rosmarinus officinalis* e do ácido rosmarínico com fluconazol;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos e suas combinações em cultura celular monocamada;
- Avaliar a toxicidade e eficácia terapêutica dos princípios ativos e suas combinações em modelo de animal alternativo.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Microrganismos e condições de crescimento

Foram utilizadas cepas padrão de *Candida tropicalis* ATCC 750 e *Candida glabrata* ATCC 90180 cultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (Acumedia, EUA) por 24 horas a 37°C.

3.1.2 Princípios ativos

Os compostos utilizados foram fluconazol (FCZ; Sigma-Aldrich, MO, EUA), anfotericina B (AMB; Sigma-Aldrich, Alemanha), ácido rosmarínico (AR; Sigma-Aldrich) e extrato seco de *Rosmarinus officinalis* (ERO; USP, EUA). O FCZ foi solubilizado em água, e AMB, AR e ERO foram solubilizados em dimetil sulfóxido (DMSO). Todas as soluções foram armazenadas a - 80°C.

3.1.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A CIM foi avaliada usando o ensaio de microdiluição em caldo conforme o protocolo M27-A3 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2008).

Os compostos foram adicionados em diluições seriadas com concentrações de 3,9 a 2000 µg/mL para ERO e 7,8 a 4000 µg/mL para AR em uma placa de 96 poços. AMB e FCZ foram utilizados como fármacos controles.

A atividade antifúngica do ERO e AR foi avaliada a uma concentração final de $2,5 \times 10^3$ UFC/mL em meio RPMI-1640 (Sigma-Aldrich, MO, EUA).

As placas foram incubadas em um agitador a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e 150 r.p.m. por 24 horas. Após esse período, a resazurina (Sigma-Aldrich) foi adicionada para avaliar a viabilidade celular fúngica. As células foram incubadas por 3,5 horas, totalizando 27,5 horas para a leitura final da CIM em 530 a 570 nm. A CIM foi determinada visualmente observando uma mudança de cor. A CFM foi avaliada transferindo uma porção do poço para a placa contendo Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubada a $37^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas. Em seguida, a CFM foi definida como a menor concentração que impediu qualquer crescimento fúngico (CLSI, 2008).

3.2 Avaliação da atividade antifúngica combinatória

A determinação da atividade antifúngica combinatória de ERO e AR com FCZ, assim como a associação entre eles, foi realizada utilizando o ensaio "checkerboard", seguindo os procedimentos descritos por Bellio *et al.* (2021) e CLSI (2008). O ERO foi avaliado em uma faixa de concentração de 0,49 a 500 µg/mL, o AR, de 0,06 a 62,5 µg/mL e o FCZ, de 0,06 a 4,0 µg/mL, todos diluídos em meio RPMI. Os resultados foram obtidos através de um leitor de microplacas a 570 nm. Para avaliar os tipos de interações entre as substâncias, foi utilizado o método do menor Índice de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), determinado de acordo com a Equação 1 (Sopirala *et al.*, 2010):

$$\text{ICIF} = \frac{\text{CIM composto 1 em combinação}}{\text{CIM composto 1}} + \frac{\text{CIM composto 2 em combinação}}{\text{CIM composto 2}} \quad \text{Eq. 1}$$

De acordo com o valor da ICIF obtida, determinou-se a interação entre os compostos testados com FCZ em: sinérgica ($ICIF \leq 0,5$), parcialmente sinérgica ($0,5 < ICIF < 1,0$), aditiva ($ICIF = 1,0$), indiferente ($1,0 < ICIF < 4,0$) ou antagônica ($4,0 \leq ICIF$) (Sader; Huynh; Jones, 2003).

No método do menor ICIF, é inicialmente necessário identificar os poços nos quais ocorreu crescimento e não crescimento fúngico. No presente estudo, considerou-se que poços com crescimento fúngico eram aqueles que apresentavam menos de 80% de inibição do crescimento, enquanto os poços de não crescimento eram aqueles com mais de 80% de inibição do crescimento fúngico.

3.3 Avaliação da citotoxicidade dos compostos bioativos em cultura celular

A citotoxicidade de ERO e FCZ foi avaliada na linhagem celular Vero (células epiteliais renais normais) obtida da ATCC (VA, EUA). As células foram adicionadas em placas de 96 poços, cada poço contendo $2,0 \times 10^4$ células. As placas foram incubadas a 37°C com 5% de CO_2 por 24 horas para formar uma monocamada celular (Husøy; Syversen; Jenssen, 1993). As formulações foram analisadas em diferentes concentrações, variando de 3,91 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ para ERO e de 0,08 a 42,67 $\mu\text{g/mL}$ para FCZ em diluições seriadas. A combinação foi testada pontualmente na concentração de 2,0 $\mu\text{g/mL}$ FCZ + 0,98 $\mu\text{g/mL}$ ERO. A citotoxicidade foi avaliada usando o ensaio de resazurina a 0,01% e medida por um leitor de microplacas a 570 nm. Células não tratadas foram incluídas como grupo de controle de células viáveis. Os resultados foram avaliados em três ensaios independentes. O valor da concentração efetiva 50% (CE_{50}) foi definido como a concentração do medicamento na qual 50% das células permaneceram viáveis em relação ao controle (Medina-Alarcón *et al.*, 2020).

O índice de seletividade (IS) do ERO e da combinação (FCZ + ERO) foi calculado utilizando a razão entre a CE_{50} e a concentração inibitória mínima 50% (CIM_{50}). Um IS maior que dez, indica que o medicamento é mais ativo contra a levedura e menos citotóxico para o hospedeiro, sendo considerado um valor promissor para as formulações analisadas (Orme, 2001).

A CE_{50} e o IS foram calculados de acordo com a Equação 2:

$$IS = \frac{\text{Concentração efetiva 50\% (CE}_{50})}{\text{Concentração inibitória mínima 50\% (CIM}_{50})}$$

Eq. 2

3.4 Avaliação de toxicidade de compostos bioativos em modelo animal alternativo (*Tenebrio molitor*)

Foram selecionadas 10 larvas por grupo com peso entre 100 e 200 mg.

A avaliação da toxicidade de compostos bioativos em *T. molitor* foi realizada dividindo as larvas em um grupo de controle negativo, dois grupos de controle de tratamento e grupos de larvas que receberam os compostos avaliados no estudo. Com o auxílio de uma seringa de Hamilton, foram administrados 10 µL dos os compostos estudados conforme apresentado na Tabela 1, de forma a introduzir a agulha da seringa na larva apenas uma vez. Finalmente, as larvas foram incubadas a 37°C com alimento e ao abrigo da luz e a sobrevivência foi avaliada diariamente por 7 dias para a construção da curva de sobrevivência (Scorzoni *et al.*, 2015; Morey *et al.*, 2016; Palanco *et al.*, 2017; Singulani *et al.*, 2018; Naliato, 2022).

Tabela 1 - Concentração dos princípios ativos e combinações administradas em *T. molitor*.

Grupos	Concentração (µg/mL)	Volume princípio ativo (µL)	Volume PBS (µL)	Total volume administrado/larva (µL)
FCZ+ERO	2,0 + 0,98	5,0	5,0	10,0
	200 + 98,0	5,0	5,0	10,0
	400 + 196	5,0	5,0	10,0
FCZ	2,0	5,0	5,0	10,0
ERO	0,98	5,0	5,0	10,0
Controle de tratamento (AMB)	14,0	5,0	5,0	10,0
Controle de tratamento (FCZ (350 µg/mL))	350	5,0	5,0	10,0
Controle negativo	-	-	10,0	10,0

3.5 Avaliação da eficácia terapêutica em modelo animal alternativo (*Tenebrio molitor*)

3.5.1 Curva de sobrevivência

Assim como no ensaio de toxicidade no modelo alternativo, foram selecionadas 10 larvas por grupo, cada uma pesando entre 100 e 200 mg. As larvas foram injetadas com os compostos estudados conforme apresentado na Tabela 2 e da mesma forma do ensaio anterior. A concentração do inóculo utilizada foi de $1,0 \times 10^9$ UFC/mL ou $5,0 \times 10^6$ UFC/larva. As larvas foram incubadas a 37°C e observadas por 7 dias para registrar o número de larvas mortas.

Tabela 2 - Concentração dos princípios ativos, combinações e inóculo de *C. glabrata* administrados em *T. molitor*.

Grupos	Concentração (µg/mL)	Volume princípio ativo (µL)	Volume PBS (µL)	Volume inóculo (µL)	Total volume administrado/larva (µL)
FCZ+ERO	2,0 + 0,98	5,0	0,0	5,0	10,0
	200 + 98,0	5,0	0,0	5,0	10,0
	400 + 196	5,0	0,0	5,0	10,0
FCZ	2,0	5,0	0,0	5,0	10,0
ERO	0,98	5,0	0,0	5,0	10,0
Controle de tratamento (FCZ (350 µg/mL))	350	5,0	0,0	5,0	10,0
Controle negativo	-	-	10,0	-	10,0
Controle infecção	-	-	5,0	5,0	10,0

3.6 Análise estatística

Os resultados obtidos foram tratados com o software GraphPad Prism 5 (CA, EUA). A análise estatística dos dados do teste de citotoxicidade foi feita usando a análise de variância unidirecional comum, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Dunnett. Valores de $p < 0.05$, < 0.01 e < 0.0001 foram considerados estatisticamente significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM)

Utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo e o plaqueamento dos poços do ensaio da avaliação da concentração inibitória mínima, foi possível determinar a atividade fungistática e fungicida *in vitro* do extrato de *Rosmarinus officinalis* (ERO), ácido rosmarínico (AR) e fluconazol (FCZ) e os resultados estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 3 - Resultados das CIM₈₀ e CFM em µg/mL de FCZ, ERO e AR para *C. tropicalis* e *C. glabrata*

	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750		<i>C. glabrata</i> ATCC 90180	
	CIM ₈₀	CFM	CIM ₈₀	CFM
FCZ	0,25	>64,00	2,00	>64,00
ERO	500	2000	31,25	>2000
AR	>4000	>4000	0,98	>4000

Conforme os resultados obtidos, tanto a *C. tropicalis* quanto a *C. glabrata* foram sensíveis ao ERO dentro da faixa de concentração testada. Entretanto, foi observada uma maior sensibilidade da *C. glabrata* ao ERO em comparação com a *C. tropicalis*, sendo classificada com uma forte atividade antifúngica (CIM₈₀: 31,25 µg/mL) (Sartoratto *et al.*, 2004). Quanto à atividade fungicida, o ERO mostrou atividade apenas para a *C. tropicalis* na concentração de 2000 µg/mL, enquanto para *C. glabrata*, a mesma concentração não foi eficaz.

O AR mostrou atividade fungistática apenas contra a *C. glabrata* (CIM₈₀ igual a 0,98 µg/mL) e nenhuma atividade fungicida, dentro da faixa de concentração estudada.

Os resultados obtidos são promissores, uma vez que a *C. glabrata* demonstrou maior resistência ao FCZ em comparação com a *C. tropicalis*. No entanto, frente aos princípios ativos naturais, a *C. glabrata* revelou-se mais suscetível, o que é um achado interessante. Esses resultados indicam que os ingredientes ativos naturais possuem uma atividade antifúngica significativa, especialmente contra cepas resistentes de *C. glabrata*.

O AR não demonstrou atividade contra *C. tropicalis* e o ERO demonstrou fraca atividade antifúngica contra a espécie, por isso os demais ensaios foram conduzidos utilizando os resultados obtidos somente contra *C. glabrata*.

Quanto aos resultados comparando os dois princípios ativos naturais, o ERO apresentou melhor resposta antifúngica, portanto os seguintes ensaios foram executados principalmente com ele.

4.2 Avaliação da citotoxicidade dos compostos bioativos em cultura celular monocamada

Segundo a ISO 10993, um órgão internacional de padronização, o teste de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material destinado a dispositivos biomédicos. Após confirmar sua não toxicidade, é possível prosseguir com o estudo da biocompatibilidade do produto, realizando os demais ensaios necessários. Portanto, as citotoxicidades do FCZ e ERO foram avaliadas na linha celular Vero, e os resultados estão representados nas Figuras 1 e 2.

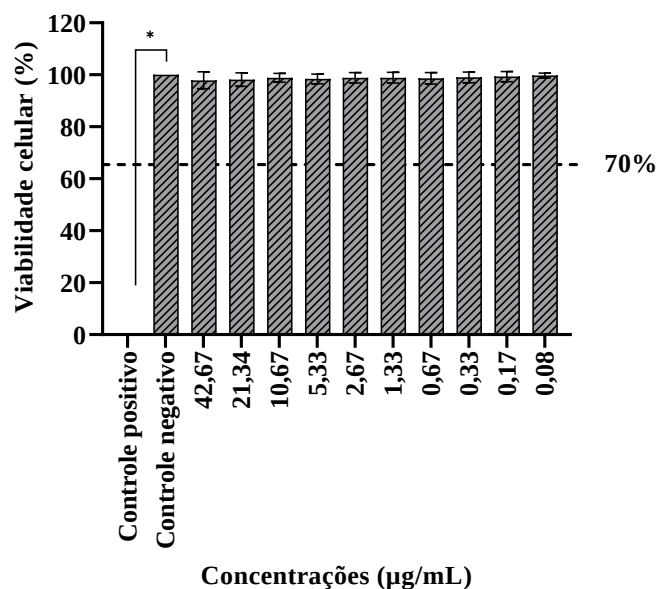


Figura 1 - Citotoxicidade do fluconazol na linhagem celular Vero. Dados apresentados como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa: * $p < 0,0001$.

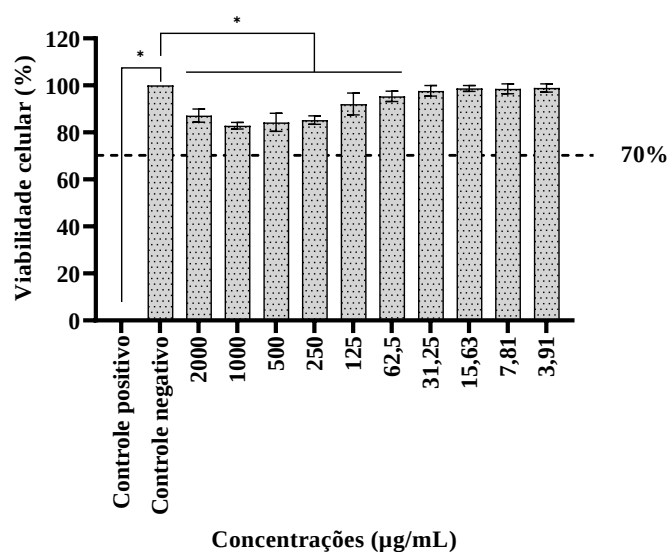


Figura 2 - Citotoxicidade do extrato de *Rosmarinus officinalis* na linhagem celular Vero. Dados apresentados como média e desvio padrão. Diferença estatisticamente significativa: * $p < 0,0001$.

Com base na norma ISO 10993-5, um efeito é considerado citotóxico quando a viabilidade celular é reduzida a mais que 30%, o que não ocorreu para ambos os compostos estudados. Assim, a faixa de concentrações de FCZ e ERO testada não foi citotóxica para a linhagem celular Vero.

Os resultados sugerem a viabilidade de avançar para estudos adicionais de biocompatibilidade, explorando a possibilidade de empregar esses ingredientes ativos em formulações de baixa toxicidade. A Tabela 3 mostra os valores de CIM₅₀, CE₅₀ e IS de ERO e FCZ contra *C. glabrata*.

Tabela 4 - Valores de concentração inibitória mínima (CIM₅₀) para a *C. glabrata*, concentração efetiva 50% (CE₅₀) e índice de seletividade (IS) do extrato de *Rosmarinus officinalis* (ERO) e do fluconazol (FCZ) em linhagem celular Vero.

	CIM ₅₀ (µg/mL)	CE ₅₀ (µg/mL)	IS
ERO	31,25	119,10	3,81
FCZ	2,00	≥ 42,67	> 10

A CE₅₀ e o IS são parâmetros que indicam dois valores importantes para estimar a janela terapêutica. Valores de índice de seletividade acima de 10 indicam ausência de toxicidade para a célula hospedeira, enquanto valores abaixo de 10 indicam toxicidade (Protopopova *et al.*, 2005). O IS para ERO foi inferior a 10 (3,81), demonstrando, assim, toxicidade para a célula Vero. Por outro lado, o IS para FCZ foi superior que 10, ou seja, foi atóxica para as células.

Vale ressaltar que no modelo de cultura celular em monocamada, oxigênio e nutrientes não são distribuídos de maneira uniforme fisiologicamente, uma vez que um lado da célula está aderido à superfície do substrato. De acordo com *Cultivo de células: da teoria à bancada* (2020), essas são limitações desse modelo que podem demonstrar uma maior toxicidade em comparação com a exposição de ingredientes ativos em culturas celulares tridimensionais, por exemplo.

4.3 Avaliação da atividade antifúngica combinatória

Ao identificarmos a interface de crescimento desejável e indesejável da *C. glabrata* diante das combinações estudadas, calculamos o menor ICIF para cada uma delas. Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 5 - Resultados dos menores Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF) obtidos na avaliação da atividade antifúngica combinatória, as concentrações dos princípios ativos associados, porcentagem de inibição do crescimento fúngico e tipo de interação frente à *C. glabrata*.

	Menor ICIF	Concentração (µg/mL)	Inibição (%)	Interação
FCZ + ERO	0,5	2,00 + 0,98	82,05	SIN
FCZ + AR	0,8	1,00 + 0,24	98,53	AD
	0,8	0,50 + 0,49	93,55	AD
ERO + AR	0,8	15,60 + 0,24	84,73	AD

SIN: sinérgica; AD: aditiva.

Das três combinações testadas, apenas a FCZ com ERO demonstrou interação sinérgica entre os compostos, ou seja, foi necessária uma concentração menor que a CIM dos princípios ativos individualmente para se ter uma elevada atividade antifúngica.

As demais associações apresentaram interação aditiva e não foram mais vantajosas, porém não indicaram ausência de atividade ou um efeito antagônico. Nas concentrações testadas, o efeito da associação foi equivalente a soma aritmética dos efeitos dos princípios ativos individualmente.

4.4 Avaliação da citotoxicidade da associação do fluconazol com extrato de *R. officinalis* em cultura celular em monocamada

Com o objetivo de verificar se a interação sinérgica obtida com a associação do fluconazol com extrato de *R. officinalis* no ensaio de atividade antifúngica combinatória seria prejudicial às células humanas renais, foi realizado o ensaio de citotoxicidade da combinação FCZ (2,00 µg/mL) + ERO (0,98 µg/mL) em linhagem celular Vero. A Tabela 5 mostra os resultados desta combinação na concentração correspondente ao menor ICIF e a porcentagem de viabilidade celular da linhagem celular Vero.

Tabela 6 - Porcentagem de viabilidade celular para a concentração correspondente ao menor ICIF obtido em linhagem celular Vero.

	Viabilidade celular (%)
FCZ (2,00 µg/mL) + ERO (0,98 µg/mL)	85,10%

Na concentração estudada, foi observada porcentagem de viabilidade celular de 85,10%, ou seja, ausência de citotoxicidade de acordo com a norma ISO 10993-5 (>70%).

Assim, apesar de ERO, isoladamente, ter apresentado toxicidade para a célula Vero segundo a classificação por IS, sua combinação com FCZ na concentração de menor ICIF demonstrou alta viabilidade celular. A partir desses resultados podemos dizer que esta é uma combinação interessante, uma vez que com a associação dos compostos foi necessária menor concentração do ERO, em comparação a ele isoladamente, para se ter alta atividade antifúngica e taxa de viabilidade das células renais.

4.5 Avaliação da toxicidade em modelo animal alternativo (*Tenebrio molitor*)

No ensaio de avaliação da toxicidade em *T. molitor*, foi construída uma curva de sobrevivência mediante a quantificação das mortes das larvas avaliadas durante 7 dias e os resultados estão apresentados na Figura 3.

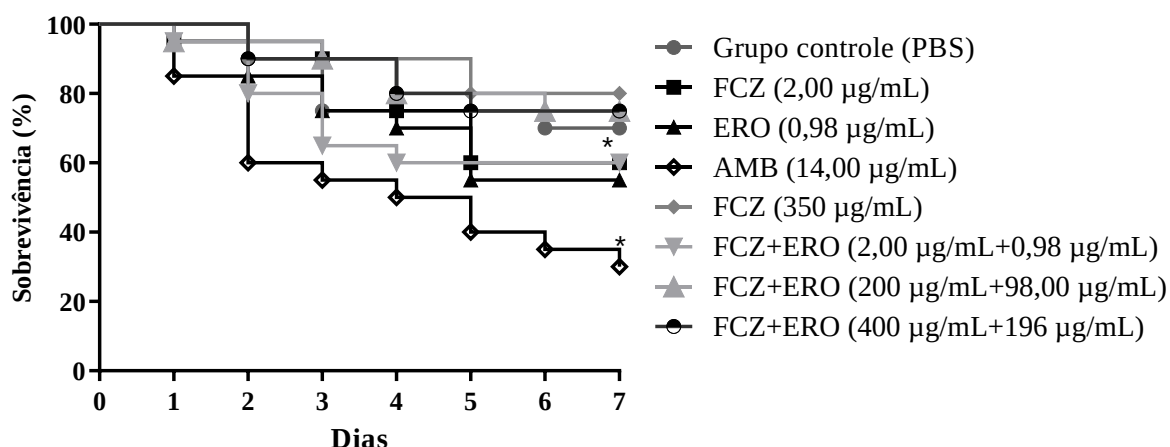


Figura 3 - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* a administração das injeções dos princípios ativos isolados, as combinações e o controle. Diferença estatisticamente significativa: * $p < 0,01$.

As curvas de sobrevivência mostradas na Figura 3 demonstraram nenhuma diferença significativa em comparação ao grupo controle (PBS), ou seja, nenhuma das doses estudadas causou toxicidade *in vivo* no modelo utilizado, com exceção da AMB.

A administração de AMB nas larvas foi realizada para se ter uma comparação com um tratamento comumente utilizado, e foi observada uma redução significativa na sobrevivência das larvas, o que já era esperado, uma vez que a AMB é um princípio ativo com alta toxicidade. Esses dados reforçam a importância da proposta deste trabalho em utilizar substâncias eficazes contra *C. glabrata*, mas com toxicidade reduzida.

4.6 Avaliação da eficácia terapêutica em modelo animal alternativo (*Tenebrio molitor*)

4.6.1 Padronização das condições experimentais no modelo de infecção

Devido à existência de poucos estudos publicados com *T. molitor*, foram realizados alguns testes preliminares para padronizar os testes de segurança toxicológica e eficácia terapêutica no modelo. Um desses testes tinha o objetivo de verificar se o volume administrado teria influência na sobrevivência das larvas.

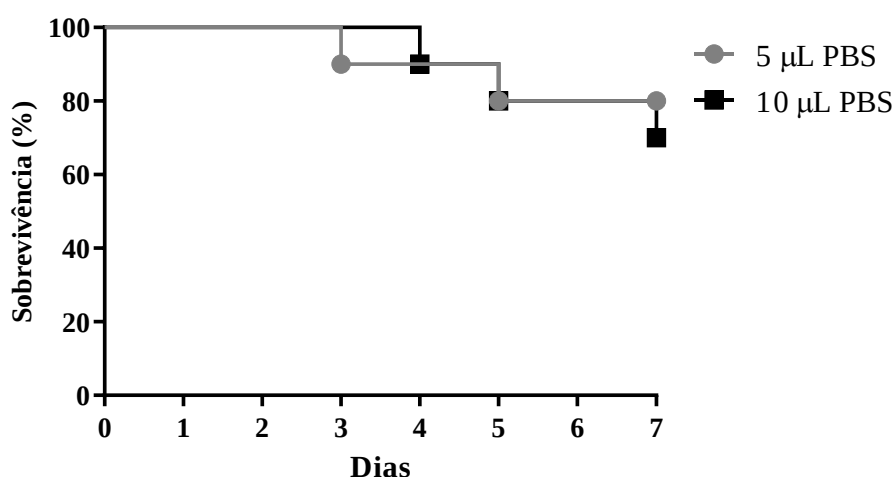


Figura 4 - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* após inoculação com 5µL e 10µL de PBS.

Conforme observado na Figura 4, não houve diferença significativa entre a administração dos dois volumes. Portanto, decidiu-se prosseguir os ensaios com o volume de 10 µL, uma vez que esse volume torna mais precisa a administração concomitante de 5 µL de duas soluções distintas em uma larva.

Outro teste preliminar importante foi o teste de virulência, para verificar qual concentração de UFC de *C. glabrata* por larva seria ideal para avaliar a eficácia terapêutica dos compostos em *T. molitor*.

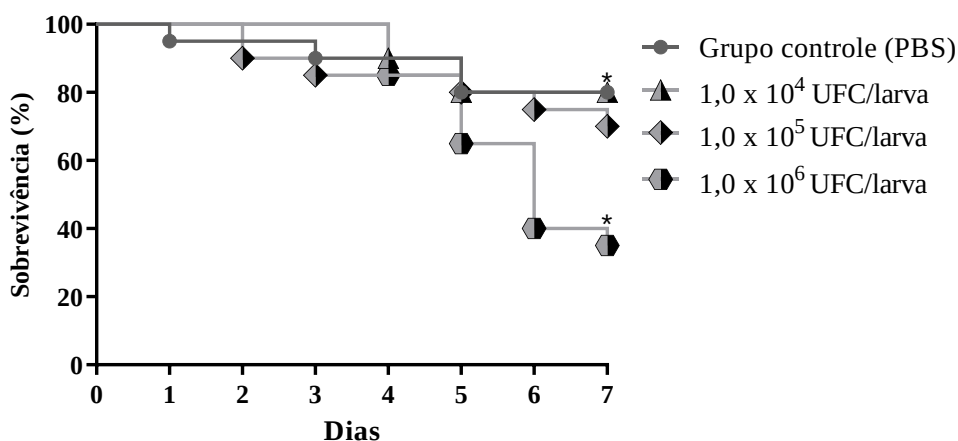


Figura 5 - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* após infecção com *C. glabrata* em concentrações de $1,0 \times 10^4$, $1,0 \times 10^5$ e $1,0 \times 10^6$ UFC/larva. Diferença estatisticamente significativa: * $p < 0,05$.

Por meio deste ensaio, foi observado que o grupo de larvas que recebeu $1,0 \times 10^6$ UFC/larva apresentou uma redução de sobrevivência significativa em comparação com o grupo controle (PBS), mas não foi suficiente para causar a morte de todas as larvas do grupo em 7 dias. Por outro lado, os grupos que receberam $1,0 \times 10^4$ e $1,0 \times 10^5$ UFC/larva não apresentaram diferença estatística em comparação com o grupo

de controle. Assim, buscando evidenciar melhor o efeito dos tratamentos, decidiu-se aumentar a concentração para $5,0 \times 10^6$ UFC/larva para dar sequência ao ensaio de eficácia terapêutica.

4.6.2 Curva de sobrevivência

As mesmas doses estabelecidas na Tabela 1 foram utilizadas para avaliar a atividade antifúngica *in vivo* no modelo de *T. molitor* após a infecção das larvas com *C. glabrata*.

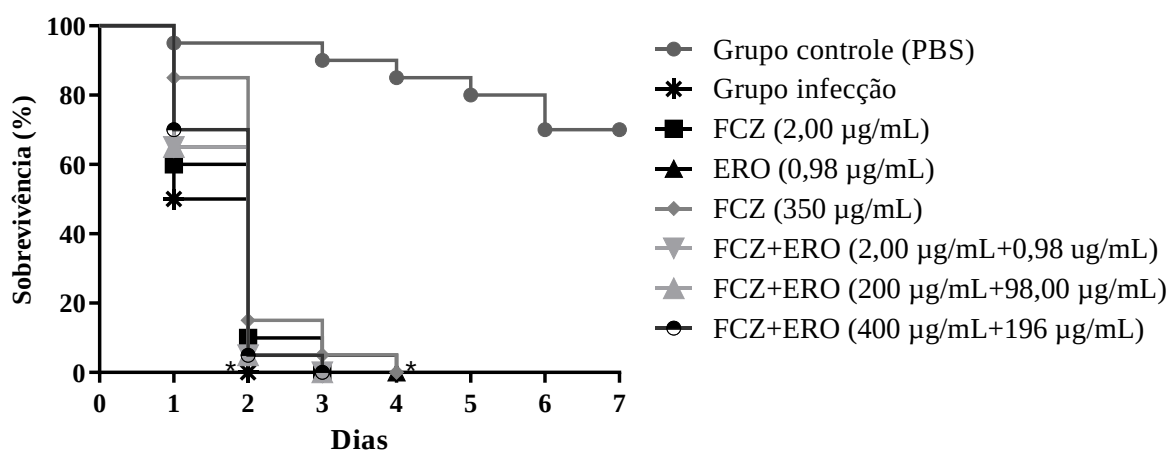


Figura 6 - Curvas de sobrevivência de *T. molitor* após infecção com *C. glabrata* e tratamento com os princípios ativos isoladamente, as combinações e os controles. FCZ 350 µg/mL e PBS foram utilizados como controles de tratamento positivo e negativo, respectivamente. Diferença estatisticamente significativa: * $p < 0,01$.

A Figura 6 mostra uma redução acentuada na sobrevivência das larvas e todos os tratamentos administrados não apresentaram diferença estatística em relação ao grupo de infecção, exceto pelo grupo que recebeu FCZ a 350 µg/mL.

A partir do segundo dia de avaliação das larvas, todos os grupos tiveram uma redução da sobrevivência inferior a 20%. Isso indica que o inóculo de $5,0 \times 10^6$ UFC/larva superou os tratamentos testados.

Dado os resultados observados, é possível inferir que os princípios ativos apresentaram atividade antifúngica e ausência de toxicidade para as células humanas, porém o modelo não foi ideal para o estudo destes compostos antifúngicos especificamente, sejam eles em combinação ou não.

5 CONCLUSÃO

Neste estudo, verificamos que tanto o extrato de *Rosmarinus officinalis* (ERO) quanto o ácido rosmarínico (AR) apresentaram atividade fungistática contra *C. glabrata*, sendo que o ERO apresentou melhores resultados. Além disso, as combinações com o AR não foram as mais vantajosas, sendo preferível o avanço dos ensaios com a combinação de fluconazol (FCZ) com ERO.

Os resultados encontrados demonstraram que a combinação de FCZ com ERO possui propriedades fungistáticas, e melhor desempenho em combinação em comparação aos compostos isolados, visto sua interação sinérgica contra a *Candida glabrata*, e manteve uma alta taxa de viabilidade das células renais.

A combinação tem o potencial para ser uma alternativa de baixa toxicidade e elevada eficácia no tratamento de infecções causadas por *C. glabrata*. Assim, os resultados deste trabalho podem ser utilizados como a primeira etapa para o desenvolvimento de novas terapias antifúngicas utilizando ERO e para posteriores ensaios pré-clínicos e clínicos.

6 REFERÊNCIAS

- ADEME, M.; GIRMA, F. *Candida auris*: From Multidrug Resistance to Pan-Resistant Strains. **Infection and Drug Resistance**, Etiópia, v. 13, p. 1287-1294, 2020. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7211321/pdf/idr-13-1287.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- ALMEIDA, de I. M. et al. A recidiva da candidíase oral em pessoas vivendo com HIV. **Revista Multidisciplinar em Saúde**, [s. l.], v. 2, n. 4, p. 87, out. 2021. Disponível em: <https://editoraime.com.br/revistas/index.php/remas/article/view/2231>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- BELLIO, P. et al. New and simplified method for drug combination studies by checkerboard assay. **MethodsX**, L'Aquila, v. 8, p. 101543, out. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2215016121003356>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **M27-A3**: Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard – third edition . Wayne: CLSI, 2008.
- CULTIVO DE CÉLULAS: da teoria a bancada. João Pessoa: Editora UFPB, 2020.
- DIASS, K. et al. Biological and pharmaceutical properties of essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. and *Lavandula officinalis* L. **Materials Today**: Proceedings, Oudja, v. 45, p. 7768-7773, jun. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785321025803>. Acesso em: 02 set. 2023.
- DOMINGOS, I. et al. Características gerais da ação, do tratamento e da resistência fúngica ao fluconazol. **Scientia Medica**, Porto Alegre: PUCRS, v. 15, n. 3, 2005.
- FARIAS, L. A. B. G.; SANTOS, A. P. de S; DAMASCENO, L. S. Candidemia associada à infecção por SARS-CoV-2: um relato de dois casos. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Fortaleza, v. 25, p. 101385, 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1413867020305122>. Acesso em: 19 ago. 2023.
- FICA C., A. Tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas Primera parte: fluconazol, itraconazol y voriconazol. **Revista chilena de infectología**, Santiago, v. 21, n. 1, p. 26-38, 2004. Disponível em: https://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182004000100004&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 19 ago. 2023.

FORMIGA, R. O. et al. Effect of p-cymene and rosmarinic acid on gastric ulcer healing - Involvement of multiple endogenous curative mechanisms. **Phytomedicine**, João Pessoa, v. 86, p. 153497, mai. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0944711321000398>. Acesso em: 19 ago. 2023.

GÖRKEM, A. et al. Coronavirus disease and candidemia infection: A case report. **Journal of Medical Mycology**, Kayseri, v. 31, n. 3, set. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523321000457?via%3Dihub>. Acesso em: 19 ago. 2023

HASSAN, Y.; CHEW, S. Y.; THAN, L. T. L. Candida glabrata: Pathogenicity and Resistance Mechanisms for Adaptation and Survival. **Journal of Fungi**, Kano, v. 7, n. 8, ago. 2021. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2309-608X/7/8/667>. Acesso em: 02 set. 2023.

HUSØY, T.; SYVERSEN, T.; JENSSEN, J. Comparisons of four in vitro cytotoxicity tests: The MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicology in Vitro**, Trondheim, v. 7, n. 2, p. 149-154, mar. 1993. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/088723339390125O>. Acesso em: 19 ago. 2023.

INTERNATIONAL STANDARD. **Biological evaluation of medical devices** - Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity. Genebra: ISO 10993-5, 2009.

JOHNSON, M. D. et al. Combination Antifungal Therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, [s. l.], v. 48, n. 3, p. 693-715, mar. 2004. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/abs/10.1128/aac.48.3.693-715.2004>. Acesso em: 19 ago. 2023.

KAMELABAD, M. R. et al. Influence of curcumin and rosmarinic acid on disrupting the general properties of Alpha-Synuclein oligomer: Molecular dynamics simulation. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, Tabriz, v. 107, p. 107963, jun. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1093326321001340>. Acesso em: 19 ago. 2023.

LIVERTOX: CLINICAL AND RESEARCH INFORMATION ON DRUG-INDUCED LIVER INJURY Bethesda: NIH, 2012. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK548300/>. Acesso em: 19 ago. 2023.

MATSUI, H.; HIGASHIDE, M.; HANAKI, H. Evaluation of a rapid immunochromatographic test for the detection of Candida species from oropharyngeal samples. **Journal of Microbiological Methods**, Tokyo, v. 179, 2020. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016770122030806X>. Acesso em: 19 ago. 2023.

MEDINA-ALARCÓN, K. P. et al. Antifungal activity of 2'-hydroxychalcone loaded in nanoemulsion against *Paracoccidioides* spp. **Future Microbiology**, Araraquara, v. 15, n. 1, p. 21-33, jan. 2020. Disponível em: https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2019-0095?rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed. Acesso em: 19 ago. 2023.

MOREY, A. T. et al. Antifungal Activity of Condensed Tannins from *Stryphnodendron adstringens*: Effect on *Candida tropicalis* Growth and Adhesion Properties. **Londrina**, v. 17, p. 365-375, 2016.

NADEEM, M. et al. **Therapeutic Potential of Rosmarinic Acid**: a comprehensive review. **Applied Sciences**, Vehari, v. 9, n.15, 2020. Disponível em: https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2019-0095?rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub=pubmed. Acesso em: 02 set. 2023.

NALIATO, G. F. S. **Modelo invertebrado *Tenebrio molitor* para avaliação da virulência de espécies clínicas e ambientais de fungos patogênicos do gênero *Sporothrix***. Natal: UFRGN, fev. 2022.

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Aberdeen, v. 52, n. 1, p. 1, 2003. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/52/1/1/930000>. Acesso em: 19 ago. 2023.

ORME, I. Search for New Drugs for Treatment of Tuberculosis. **American Society for Microbiology**: antimicrobial agents and chemotherapy, Fort Collins, v. 45, n. 7, p. 1943-1946, 2001. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/aac.45.7.1943-1946.2001>. Acesso em: 19 ago. 2023.

PALANCO, A. C. et al. Activity of 3'-hydroxychalcone against *Cryptococcus gattii* and toxicity, and efficacy in alternative animal models. **Future Medicine**, Araraquara, v. 12, p. 1123-1134, 2017. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2017-0062>. Acesso em: 19 ago. 2023.

Ponzio, V. Candidíase invasiva. **Infecções Hospitalares e Resistência Antimicrobiana**. São Paulo, 2015. (Curso online)

PROTOPOPOVA, M. et al. Identification of a new antitubercular drug candidate, SQ109, from a combinatorial library of 1,2-ethylenediamines. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 5, p. 968-974, 2005. Disponível em: <https://academic.oup.com/jac/article/56/5/968/893073>. Acesso em: 02 set. 2023.

SADER, H. S.; HUYNH, H. K.; JONES, R. N. Contemporary in vitro synergy rates for aztreonam combined with newer fluoroquinolones and beta-lactams tested against gram-negative bacilli. **Diagnostic microbiology and infectious disease**, North Liberty, v. 47, n. 3, p. 547-550, 2003. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0732889303001585?via%3Dihub>. Acesso em: 19 ago. 2023.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian journal of microbiology**, Campinas, v. 35, n. 4, p. 275-280, out. 2004. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjm/a/jCnKGdthXfczSBdb45WL4qP/>. Acesso em: 18 fev. 2024.

SILVA, D. L. et al. Fungal and bacterial coinfections increase mortality of severely ill COVID-19 patients. **Journal of Hospital Infection**, Belo Horizonte, v. 113, p. 145-154, jul. 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195670121001511?via%3Dihub>. Acesso em: 19 ago. 2023.

SILVA, J. J. et al. Candida species biotypes in the oral cavity of infants and children with orofacial clefts under surgical rehabilitation. **Microbial Pathogenesis**, Piracicaba, v. 124, p. 203-215, ago. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401018313032>. Acesso em: 19 ago. 2023.

SINGULANI, J. L. et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Medicine**, Araraquara, v. 13, p. 1637-1646, nov. 2018. Disponível em: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb-2018-0200>. Acesso em: 19 ago. 2023.

SCORZONI, L. et al. Comparison of virulence between *Paracoccidioides brasiliensis* and *Paracoccidioides lutzii* using *Galleria mellonella* as a host model. **Virulence**, Araraquara, v. 6, n. 8, p. 766-776, nov. 2015. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/21505594.2015.1085277>. Acesso em: 19 ago. 2023.

SOPIRALA, M. M. et al. Synergy Testing by Etest, Microdilution Checkerboard, and Time-Kill Methods for Pan-Drug-Resistant *Acinetobacter baumannii*. **American Society for Microbiology**: antimicrobial agents and chemotherapy, Columbus, v. 54, n. 11, p. 4678-4683, nov. 2010. Disponível em: <https://journals.asm.org/doi/full/10.1128/aac.00497-10>. Acesso em: 02 set. 2023.

WHALEY, S. G. et al. Azole Antifungal Resistance in *Candida albicans* and Emerging Non-*albicans* *Candida* Species. **Frontiers in Microbiology**, Memphis, v. 7, jan. 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2016.02173/full>. Acesso em: 19 ago. 2023.

ZUZA-ALVES, D. L.; SILVA-ROCHA, W. P.; CHAVES, G. M. An Update on *Candida tropicalis* Based on Basic and Clinical Approaches. **Frontiers in Microbiology**, Natal, v. 8, out. 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/journals/microbiology/articles/10.3389/fmicb.2017.01927/full>. Acesso em: 19 ago. 2023.