

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIA BIOMÉDICAS
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

DÉBORA MARIA SOARES RODRIGUES

OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* E *Citrus sinensis* INIBEM O
CRESCIMENTO E A FORMAÇÃO DE BIOFILME *in vitro* DE ESPÉCIES DE *Candida*

UBERLÂNDIA

2025

DÉBORA MARIA SOARES RODRIGUES

OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* E *Citrus sinensis* INIBEM O
CRESCIMENTO E A FORMAÇÃO DE BIOFILME *in vitro* DE ESPÉCIES DE *Candida*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito da disciplina TCC II.

Área de concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof. Dr. Reginaldo do Santos
Pedroso.

UBERLÂNDIA

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

R696 Rodrigues, Débora Maria Soares, 2001-
2025 OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* E *Citrus sinensis* INIBEM O CRESCIMENTO E A FORMAÇÃO DE BIOFILME in vitro DE ESPÉCIES DE *Candida* [recurso eletrônico] / Débora Maria Soares Rodrigues. - 2025.

Orientador: Reginaldo do Santos Pedroso.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em Biomedicina.

Modo de acesso: Internet.
Inclui bibliografia.

1. Ciências médicas. I. Pedroso, Reginaldo do Santos, 1972-, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Graduação em Biomedicina. III. Título.

CDU: 61

DÉBORA MARIA SOARES RODRIGUES

OS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Origanum vulgare* E *Citrus sinensis* INIBEM O
CRESCIMENTO E A FORMAÇÃO DE BIOFILME *in vitro* DE ESPÉCIES DE *Candida*

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade Federal de Uberlândia como
requisito da disciplina TCC II.

Área de concentração: Ciências da Saúde

UBERLÂNDIA, 30 de abril de 2025

Banca Examinadora:

Ralciane de Paula Menezes – Doutorado (ICBIM-UFU)

Henrique Dantas de Menezes – Doutorado (ULAC-HC-UFU)

Reginaldo dos Santos Pedroso – Doutorado (ESTES-UFU)

Dedico este trabalho à minha família, pela
motivação, confiança e compreensão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por me conceder a oportunidade de realizar este trabalho e por ser minha fonte diária de força e perseverança.

À minha mãe, Jeane, pelo apoio incondicional em cada etapa da minha trajetória, por nunca medir esforços para garantir minha educação e desenvolvimento, e à minha família, por ser uma base sólida ao longo da graduação, em especial, ao meu irmão Lucas e à minha cunhada Ana, pelo carinho e suporte constante.

Aos meus amigos, tanto os de longa data quanto os que tive a alegria de conhecer durante a graduação, agradeço a presença, companheirismo e por tornarem esse caminho mais leve e significativo.

Ao meu orientador, Professor Dr. Reginaldo dos Santos, por todo o incentivo, auxílio e direcionamento na execução deste trabalho e de minha vida acadêmica e à Professora Dr^a. Ralciane de Paula Menezes, por abrir as portas para mim no laboratório de Análises Clínicas da Escola Técnica de Saúde (ESTES) e por todo o ensinamento.

À ESTES e Universidade Federal de Uberlândia (UFU), pela Bolsa de Iniciação Científica concedida pelo CNPq, conforme Edital DIRPE 2/2023, referente à Convocação de Projetos de Pesquisa para seleção de bolsas de iniciação científica PIBIC/CNPQ/FAPEMIG/UFU.

RESUMO

As infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida* têm aumentado ao longo dos anos e o arsenal terapêutico continua limitado. Espécies emergentes como *Candida auris*, além das já conhecidas *C. glabrata*, *C. krusei* e *C. parapsilosis*, têm demonstrado elevada resistência a múltiplas classes de antifúngicos, como azóis, equinocandinas e polienos. Essa resistência compromete a eficácia dos tratamentos disponíveis, contribuindo para o aumento das taxas de morbidade e mortalidade, sobretudo em pacientes imunocomprometidos e em unidades de terapia intensiva. Dessa forma, cresce o interesse da comunidade científica na busca por alternativas terapêuticas seguras e eficazes, especialmente a partir de compostos naturais com potencial antifúngico. Nesse contexto, os óleos essenciais (OEs) vêm se destacando como uma promissora estratégia terapêutica. Diversos estudos demonstram que esses produtos possuem componentes bioativos capazes de inibir o crescimento de *Candida* spp. e interferir em fatores de virulência como a formação de biofilmes e a transição morfológica. Além disso, sua atividade antifúngica associada a baixo risco de resistência torna os óleos essenciais candidatos atrativos no desenvolvimento de novas formulações antifúngicas. O objetivo deste estudo foi investigar a atividade antifúngica e inibição da formação de biofilme dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Citrus sinensis* sobre isolados de espécies de *Candida*. A atividade antifúngica *in vitro* dos óleos essenciais de *O. vulgare* e de *C. sinensis* foi avaliada para espécies de *Candida albicans*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, incluindo dois isolados de cada espécie (um ATCC e outro isolado clínico). A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pelo método da microdiluição em caldo, assim como a determinação da concentração inibitória mínima de formação de biofilme (CIMB). As CIM variaram entre 250 e >4000 µg/mL. *C. sinensis* mostrou menor CIM para *C. krusei* (250 µg/mL), enquanto *O. vulgare* para *C. parapsilosis* (1000 µg/mL). A CIMB apresentou variações de 31,25 µg/mL a >4000 µg/mL. As menores CIMB de OE de *C. sinensis* foram para *C. krusei* isolado clínico (31,25 µg/mL) e *C. albicans* ATCC 90028 (62,525 µg/mL). As menores CIMB do OE *O. vulgare* foi para o isolado clínico de *C. parapsilosis* (500 µg/mL) e a viabilidade celular foi a cepa padrão de *C. krusei*. A concentração fungicida mínima (CFM) determinou-se pela transferência de 5 µL de suspensão de células de cada poço para uma placa contendo SDA, seguido de incubação por 48 h a 30°C.

A CFM foi correspondente à concentração do poço onde não houver crescimento de colônias de levedura. Os óleos essenciais testados demonstraram atividades antifúngicas promissoras nos testes realizados *in vitro*, inibindo o crescimento e a formação de biofilme. Estudos futuros possibilitarão identificar os componentes químicos envolvidos, entender o mecanismo de ação antifúngica e avaliar estratégias farmacêuticas para aplicação clínica.

Palavras-chave: *Candida* spp.; *Citrus sinensis*; *Origanum vulgare*; Óleo essencial; Resistência antifúngica; Biofilme microbiano.

ABSTRACT

Fungal infections caused by *Candida* species have increased over the years, while the therapeutic arsenal remains limited. Emerging species such as *Candida auris*, along with well-known pathogens like *C. glabrata*, *C. krusei*, and *C. parapsilosis*, have demonstrated high resistance to multiple classes of antifungal agents, including azoles, echinocandins, and polyenes. This resistance compromises the effectiveness of current treatments, contributing to higher morbidity and mortality rates, particularly among immunocompromised patients and those in intensive care units. As a result, the scientific community has shown growing interest in the search for safe and effective therapeutic alternatives, especially those derived from natural compounds with antifungal potential.

In this context, essential oils have emerged as a promising therapeutic strategy. Several studies have shown that these products contain bioactive components capable of inhibiting the growth of *Candida* spp. and interfering with virulence factors such as biofilm formation and morphological transition. Furthermore, their antifungal activity combined with a low risk of resistance makes essential oils attractive candidates for the development of new antifungal formulations. The aim of this study was to investigate the antifungal activity and biofilm formation inhibition of essential oils from *Origanum vulgare* and *Citrus sinensis* against isolates of *Candida* species. The *in vitro* antifungal activity of *O. vulgare* and *C. sinensis* essential oils were evaluated against *Candida albicans*, *Candida krusei*, and *Candida parapsilosis*, including two isolates of each species (one ATCC strain and one clinical isolate). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined using the broth microdilution method, as well as the minimum biofilm inhibitory concentration (MBIC). The MIC values ranged from 250 to >4000 µg/mL. *C. sinensis* showed the lowest MIC against *C. krusei* (250 µg/mL), while *O. vulgare* had the lowest MIC against *C. parapsilosis* (1000 µg/mL). MBIC values ranged from 31.25 µg/mL to >4000 µg/mL. The lowest MBICs for *C. sinensis* essential oil were observed for the clinical isolate of *C. krusei* (31.25 µg/mL) and the *C. albicans* ATCC 90028 strain (62.5 µg/mL). The lowest MBICs for *O. vulgare* were observed for the clinical isolate of *C. parapsilosis* (500 µg/mL), and the greatest cell viability inhibition was noted for the standard strain of *C. krusei*. The minimum fungicidal concentration (MFC) was determined by transferring 5 µL of cell suspension from each well to a plate containing Sabouraud Dextrose Agar (SDA), followed by

incubation for 48 h at 30°C. The MFC was the concentration in the well where no yeast colony growth was observed. The tested essential oils demonstrated promising antifungal activity in the in vitro assays, inhibiting both fungal growth and biofilm formation. Future studies will help identify the active chemical components, elucidate their mechanisms of antifungal action, and assess pharmaceutical strategies for clinical application.

Keywords: *Candida* spp.; *Citrus sinensis*; *Origanum vulgare*; Essential oil; Antifungal resistance; Microbial biofilm.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
2. METODOLOGIA	10
2.1 Óleos Essenciais e Espécies de <i>Candida</i>	10
2.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM)	11
2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Formação de Biofilme.....	12
3. RESULTADOS	12
4. DISCUSSÃO.....	15

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas causadas por espécies de *Candida*, têm se tornado uma preocupação crescente na área da saúde, devido à elevada incidência e resistência aos antifúngicos convencionais (Silva *et al.*, 2021). *Candida* spp. normalmente são fungos comensais e estão presentes em diversas superfícies do corpo humano, principalmente no trato gastrointestinal. Em situações de desequilíbrio ou comprometimento do sistema imunológico, podem causar infecções superficiais e sistêmicas (Bona *et al.*, 2016). As infecções geralmente são oportunistas, e alguns isolados podem ser resistentes a algumas drogas antifúngicas, justificando a necessidade de estudos que avaliem novas alternativas, auxiliares e complementares, de tratamentos destas infecções (Silva *et al.*, 2021).

As manifestações clínicas causadas por *Candida* variam desde quadros superficiais e subcutâneos até formas mais profundas e disseminadas. As apresentações mais graves ocorrem, em geral, em pacientes hospitalizados, frequentemente imunocomprometidos, submetidos a procedimentos invasivos ou em uso prolongado de antibacterianos. (Silva *et al.*, 2021; Tahtler *et al.*, 2024). As espécies mais frequentes são *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* e *C. krusei* (Silva *et al.*, 2021). As infecções não invasivas abrangem aquelas que afetam a cavidade oral, vagina, pênis e outras partes do corpo. A candidíase oral é a mais comum, afetando a mucosa oral, língua e garganta, seguida pela candidíase vulvovaginal, que resulta em corrimento vaginal, prurido intenso e vermelhidão. Por outro lado, a infecção peniana é menos frequente (Chen *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2021).

Os mecanismos que as leveduras do gênero *Candida* utilizam para invadir os tecidos do hospedeiro são muitos, dentre os quais podemos citar a filamentação, produção de enzimas e toxinas, e a capacidade de adesão, que é avaliada pela capacidade de formação de biofilme (Czechowicz *et al.*, 2022; Kadosh; Mundodi., 2020).

O termo biofilme refere-se à comunidade complexa e estruturada de microrganismos que se aderem a uma superfície e são envolvidos por uma matriz de substâncias extracelulares, constituídas de polissacarídeos e proteínas (Rather *et al.*, 2020). A formação do biofilme envolve etapas sequenciais, incluindo adesão, colonização, crescimento, amadurecimento e dispersão, sendo influenciada por fatores genéticos e ambientais. Além disso, o desenvolvimento do biofilme é regulado por uma complexa rede de comunicação intercelular conhecida como

quorum sensing, que coordena os comportamentos coletivos dos microrganismos no biofilme (Palmer *et al.*, 2024). Esse arranjo permite que os microrganismos interajam e cooperem entre si, formando uma estrutura multicelular altamente organizada. Compreender a formação e a dinâmica dos biofilmes é crucial para lidar com questões relacionadas a infecções e resistência a antimicrobianos (Tolker; Nielsen, 2015; Palmer *et al.*, 2024).

As infecções fúngicas associadas à formação de biofilmes representam uma das maiores barreiras ao tratamento antifúngico eficaz, uma vez que esses agrupamentos estruturados de microrganismos demonstram notável resistência tanto aos medicamentos quanto às respostas imunes do hospedeiro (Hawser; Douglas, 1994; Krom *et al.*, 2007).

Dentre os antifúngicos utilizados, os azólicos, como o fluconazol, interferem na produção de ergosterol, um lipídeo essencial à integridade da membrana celular dos fungos, ao inibir a ação da enzima lanosterol 14 α -desmetilase (Sagatova *et al.*, 2015). No entanto, durante o desenvolvimento do biofilme, especialmente em estágios mais avançados, observa-se uma queda no teor de ergosterol, o que pode contribuir para a diminuição da eficácia desses fármacos (Mukherjee *et al.*, 2003; Péрман; Cantón; Valentin *et al.*, 2008). Além disso, a matriz extracelular produzida pelas células do biofilme atua como uma barreira física que impede a penetração adequada dos compostos antifúngicos, restringindo sua ação às camadas mais externas da estrutura (Al-Fattani; Douglas, 2004).

Pesquisas mais recentes destacam que a complexidade bioquímica dessa matriz é um fator determinante na tolerância aos tratamentos, sugerindo a necessidade de estratégias que visem à sua degradação para aumentar a eficácia terapêutica (Cavalheiro; Teixeira, 2018; Ramage *et al.*, 2022).

Óleos voláteis, também conhecidos como óleos essenciais, são produtos resultantes do metabolismo secundário de plantas. Compostos por uma variedade de substâncias interligadas, esses óleos exibem uma gama diversificada de atividades biológicas, incluindo propriedades antimicrobianas, ansiolíticas e cicatrizantes (Mijatovic *et al.*, 2022; Sousa *et al.*, 2023). A atividade antimicrobiana desses óleos tem sido objeto de investigação, revelando resultados promissores. Os óleos essenciais emergem como possíveis componentes de terapias alternativas, ainda relativamente pouco exploradas quando comparadas às abordagens terapêuticas tradicionais (Trindade *et al.*, 2022). Apesar desse contexto, a literatura científica destaca a eficácia desses óleos, especialmente quando empregados como terapia complementar. A

utilização de OEs na medicina remonta há séculos, sendo empregados tradicionalmente para tratar diversas condições de saúde, incluindo infecções. Esses óleos são extraídos de diversas partes de plantas, como folhas, flores, frutos e raízes, e são compostos por uma complexa mistura de compostos voláteis que conferem suas propriedades terapêuticas. Sabe-se que os OEs podem interferir em processos fisiológicos das células fúngicas, afetando sua integridade de membrana, permeabilidade e funcionamento metabólico, o que resulta em inibição do crescimento e até mesmo na morte celular (Silva *et al.*, 2021).

Nesse contexto, os óleos essenciais têm emergido como potenciais agentes terapêuticos na luta contra as infecções fúngicas, devido às suas propriedades antimicrobianas, incluindo atividade antifúngica. Além disso, a formação de biofilme por *Candida* spp. é uma característica que contribui para a persistência das infecções, uma vez que o biofilme fúngico é mais resistente aos tratamentos convencionais. Portanto, a investigação de agentes que possam inibir a formação e a ação do biofilme fúngico é de extrema importância para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas mais eficazes (Bona *et al.*, 2016).

Desta forma, com a compreensão de como esses óleos essenciais interagem com os biofilmes e inibem o crescimento desses patógenos pode fornecer insights importantes para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no combate às infecções causadas por *Candida*. O objetivo do estudo foi avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais *Origanum vulgare* e *Citrus sinensis* em isolados de espécies de *Candida* por meio da determinação da concentração inibitória mínima *in vitro* e inibição da formação de biofilme.

Os OEs, em geral, possuem propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, antivirais, anti-inflamatórias e anticancerígenas. Eles contêm uma ampla variedade de compostos ativos com elevado valor biológico, sendo especialmente destacados aqueles com propriedades antimicrobianas (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020).

Origanum vulgare é uma das espécies aromáticas com uma forte tradição como especiaria e planta medicinal, mas também como uma fonte bem estabelecida de medicamentos à base de plantas na fitoterapia moderna (Lombrea *et al.*, 2020). Pesquisas biológicas identificaram doze compostos fenólicos desta planta com potente atividade antioxidante (Zhang *et al.*, 2014).

O óleo essencial de *O. vulgare* também apresenta ação contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Pesquisas demonstraram sua eficácia contra patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. A atividade antibacteriana é atribuída à

capacidade do óleo em desestabilizar as membranas celulares bacterianas, aumentando sua permeabilidade e levando à morte celular. Essa propriedade destaca o potencial do óleo de orégano como alternativa ou complemento aos antimicrobianos tradicionais, especialmente diante do aumento da resistência bacteriana (Scandorieiro *et al.*, 2016).

Estudos anteriores identificaram que alguns compostos fenólicos de medicamentos naturais possuem forte atividade antiviral. Assim, compostos isolados de *O. vulgare* foram testados à avaliação antiviral *in vitro* contra RSV (*Respiratory Syncytial Virus*), CVB3 (*Coxsackievirus B3*) e HSV-1 (*Herpes Simplex Virus Type 1*). No entanto, a maioria não apresentou efeito significativo (Zhang *et al.*, 2014).

O *Citrus sinensis* representa cerca de 70% da produção mundial de frutas cítricas e é amplamente consumido como fonte de vitamina C, um antioxidante natural com papel essencial na imunidade (Favela *et al.*, 2016; Etebu e Nwauzoma, 2014). Seu óleo essencial tem sido associado a diversas atividades biológicas, como ações antioxidante, anticâncer e antimicrobiana (Manzur *et al.*, 2023).

Estudos demonstram que o OE, extratos brutos e compostos isolados de *C. sinensis* apresentam atividade antibacteriana contra patógenos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae*, sendo a maior eficácia observada contra *E. coli* (Novais *et al.*, 2024). Além disso, o OE também possui atividade antifúngica relevante, com efeitos inibitórios sobre espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*.

O presente estudo tem como objetivo, avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais *Origanum vulgare* e *Citrus sinensis* em isolados de espécies de *Candida* por meio da determinação da concentração inibitória mínima *in vitro*, a inibição da formação de biofilme e a viabilidade celular do biofilme.

2. METODOLOGIA

2.1 Óleos Essenciais e Espécies de *Candida*

Neste estudo, foram incluídos óleos essenciais extraídos de *Origanum vulgare* e de *Citrus sinensis*, adquiridos de empresa que forneça o relatório de cromatografia do lote (Quadro 1).

Para a execução da pesquisa utilizou-se seis isolados de *Candida*, sendo três cepas padrão da ATCC (*American Type Culture Collection*) das espécies *Candida albicans* ATCC 90028, *Candida krusei* ATCC 6258 e *Candida parapsilosis* ATCC 22019 e três isolados clínicos das mesmas espécies obtidos de estudos anteriores, aprovados pelo CEP-UFU. Todos os isolados estavam armazenados em BHI glicerol, a -20°C no laboratório do Curso Técnico em Análises Clínicas da Estes-UFU. Antes da realização dos experimentos, esses microrganismos foram subcultivados em ágar Sabouraud (SDA). Os isolados clínicos foram obtidos de estudos anteriores (Felix *et al.*, 2020).

Quadro 1 – Principais componentes dos óleos essenciais de *Citrus sinensis* e *Origanum vulgare*, segundo a empresa fornecedora.

Óleo essencial	Parte da planta	Principais componentes
* <i>C. sinensis</i>	Casca	Limoneno (96,23%); δ -3-careno (0,60%); Linalool (0,45%) e Geranial (0,10%)
** <i>O. vulgare</i>	Folha	Carvaccrol (71,07%); Linalool (8,99%); γ -terpineno (4,02%); ρ -cimeno (2,92%) e Thymol (1,82%)

Fonte: Elaborada pelos autores. *Plumerya, Belo Horizonte; **doTerra, Barueri, Brasil.

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

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) foi feita pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M-27 do *Clinical Laboratory Standard International* (CLSI), conforme modificações (Silva *et al.*, 2022). Foram utilizadas placas de 96 poços de fundo chato e Caldo RPMI-1640 acrescido de glicose 2% como meio de cultura e suspensão de levedura contendo $0,5-2,5 \times 10^3$ UFC/mL na concentração final do poço. As faixas de concentração variam de 7,81 a 4000 $\mu\text{g/mL}$ para OE, 0,03 a 16 $\mu\text{g/mL}$ para anfotericina B e 0,125 a 64 $\mu\text{g/mL}$ para fluconazol, que os controles do teste (Silva *et al.*, 2022). Foi feita a leitura da CIM em espectrofotômetro a 490 nm e foi determinada pela concentração capaz de reduzir em 80% a densidade óptica (OD) do poço em relação a OD do poço controle positivo. Os pontos de corte para definir suscetibilidade foram: 80% de inibição do crescimento em comparação ao

crescimento do poço controle para fluconazol e 90% de inibição para anfotericina B e OE; as culturas foram incubadas por 24 h a 35°C.

A concentração fungicida mínima determinou-se pela transferência de 5 µL de suspensão de células de cada poço para uma placa contendo SDA, seguido de incubação por 48 h a 30°C. A CFM foi correspondente à concentração do poço onde não houver crescimento de colônias de levedura.

2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima da Formação de Biofilme

Os ensaios para a avaliação da atividade dos OEs sobre o biofilme foram realizados conforme a metodologia de microdiluição em caldo, com modificações. O inóculo inicial foi de 1×10^6 células de levedura por mililitro (cel/mL). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas para formação do biofilme.

Para avaliação da biomassa, foi aspirado o conteúdo dos poços e lavado com tampão fosfato para remoção de células não aderidas. O material foi fixado com metanol durante 190 minutos e corado com cristal violeta 1% por 20 minutos. Esta solução foi removida e o cristal aderido solubilizado pela adição de ácido acético 33% durante 30 minutos. A absorbância de cada poço determinou-se em espectrofotômetro a 595 nm. Assim determinou-se a concentração inibitória mínima do biofilme aqueles que apresentavam redução de 50% da OD.

Para a avaliação da viabilidade celular do biofilme, após 48 horas de incubação inicial, o conteúdo de cada poço foi aspirado e lavado com tampão fosfato. Em seguida, foi adicionada a solução de menadiona-MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio brometo), um sal tetrazólico utilizado para medir a atividade metabólica celular. As placas foram então incubadas por 6 horas a 37 °C. Novamente aspirado e depois lavado, o produto foi solubilizado com dimetilsulfóxido, incubado por 10 minutos, e o sobrenadante transferido para outra placa, seguida de leitura em espectrofotômetro a 490 nm. Assim, calculou-se a concentração capaz de inibir 50% da viabilidade celular do biofilme. Todos os experimentos foram realizados em três experimentos independentes.

3. RESULTADOS

Para o OE de *O. vulgare*, foi observada uma concentração inibitória mínima de 2000 µg/mL frente a maioria dos isolados testados, clínicos e ATCC *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, e para *C. parapsilosis* ATCC 22019. O isolado clínico de *C. parapsilosis* apresentou um CIM de 1000 µg/mL (Tabela1).

O OE de *Citrus sinensis* apresentou atividade antimicrobiana variável e inferior em comparação ao OE de orégano (Tabela 1). A CIM para *C. albicans* ATCC 90028 foi de 2000 µg/mL, enquanto para o isolado clínico foi superior a 4000 µg/mL. A cepa padrão ATCC e o isolado clínico de *C. krusei* apresentou CIM significativamente menor, de 250 µg/mL. Para *C. parapsilosis*, a CIM foi de 1000 µg/mL em ambos os isolados (ATCC 22019 e clínico).

No que diz respeito aos fármacos a anfotericina B apresentou resultados com variações de 0,062 a 1,0 µg/mL, sendo *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019 0,25 µg/mL. *C. albicans* isolado clínico apresentou CIM de 1,0 µg/mL, *C. krusei* clínica 0,062 µg/mL e *C. parapsilosis* clínica 0,125 µg/mL. Já com o Fluconazol teve-se uma variação de 0,125 a 64,0 µg/mL, apresentando como melhor resultado *C. albicans* isolado clínico com 0,125 µg/mL, enquanto a cepa padrão resultou CIM de 0,5 µg/mL. Os isolados de *C. krusei* apresentaram CIMs de 32,0 µg/mL e 64,0 µg/mL para a cepa ATCC e o isolado clínico, respectivamente. *C. parapsilosis* ATCC 22019 apresentou CIM de 2,0 µg/mL e isolado clínico 1,0 µg/mL.

Tabela 1 – Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Citrus sinensis*, anfotericina B e fluconazol frente a isolados de *Candida* spp.

Isolado	<i>O. vulgare</i> µg/mL		<i>C. sinensis</i> µg/mL		Anfotericina B µg/mL		Fluconazol µg/mL	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	2.000	2.000	2.000	2.000	0,25	0,25	0,5	> 64
<i>C. albicans</i> clínico	2.000	2.000	4.000	4.000	0,125	0,25	1,0	> 64
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	2.000	2.000	250	250	0,25	0,5	32	32
<i>C. krusei</i> clínico	2.000	2.000	250	250	0,062	0,062	64	> 64
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2.000	4.000	1.000	2.000	0,25	0,25	2,0	2,0
<i>C. parapsilosis</i> clínico	1.000	2.000	1.000	1.000	0,125	0,125	1,0	2,0

Fonte: Elaborada pelos autores.

A atividade antifúngica dos OEs *Origanum vulgare* *Citrus sinensis*, bem como dos antifúngicos convencionais fluconazol e anfotericina B, foi avaliada frente a isolados padrão e clínicos de *Candida* spp., por meio da determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM), expressa em $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 1).

O OE de orégano apresentou atividade fungicida contra todos os isolados testados, com valores de CFM variando de 2000 a 4000 $\mu\text{g/mL}$. Os isolados de *C. krusei* ATCC 6258 e clínico e *C. albicans* ATCC 90028 e clínico apresentaram CFM de 2000 $\mu\text{g/mL}$, enquanto os isolados de *C. parapsilosis* mostraram maior variação, com o isolado clínico mais sensível (2000 $\mu\text{g/mL}$) em comparação ao isolado padrão (4000 $\mu\text{g/mL}$).

O óleo essencial de laranja demonstrou maior variabilidade na atividade antifúngica, com CFMs variando entre 250 $\mu\text{g/mL}$ na *C. krusei* ATCC e clínico e 4000 $\mu\text{g/mL}$ com a *C. albicans* clínico. O isolado clínico de *C. parapsilosis* apresentou maior sensibilidade (CFM = 1000 $\mu\text{g/mL}$) em relação ao isolado padrão (CFM = 2000 $\mu\text{g/mL}$).

Tabela 2 – Determinação da concentração inibitória mínima de formação da biomassa do biofilme (CIMBB) e da viabilidade celular do biofilme (CIMVB) dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Citrus sinensis*, e dos antifúngicos anfotericina B e fluconazol, frente aos isolados de *Candida* spp.

Isolados	CIMBB <i>O. vulgare</i> (µg/mL)	CIMBB <i>C. sinensis</i> (µg/mL)	CIMVB <i>O. vulgare</i> (µg/mL)	CIMVB <i>C. sinensis</i> (µg/mL)	CIMBB Anfotericina B (µg/mL)	CIMBB Fluconazol (µg/mL)	CIMVB Anfotericina B (µg/mL)	CIMVB Fluconazol (µg/mL)
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	500	62,5	2000	2000	1	>64	2	>64
<i>C. albicans</i> clínico	>4000	500	2000	4000	1	>64	0,5	>64
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	500	125	1000	500	1	>64	0,5	64
<i>C. krusei</i> clínico	2000	31,25	125	62,5	1	>64	0,25	>64
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1000	125	2000	1000	1	>64	1	4
<i>C. parapsilosis</i> clínico	1000	125	2000	2000	2	>64	1	1

Fonte: Elaborada pelos autores.

Os resultados forneceram informações sobre a atividade dos OEs de *Origanum vulgare* e *Citrus sinensis* na inibição *in vitro* da formação do biofilme pelos isolados de *Candida* (Tabela 2).

No ensaio de inibição da biomassa, o OE de *O. vulgare* apresentou concentração inibitória mínima de biofilme (CIMB) de 1000 µg/mL para *C. albicans* ATCC 90028, *C. krusei* ATCC 6258 e *C. parapsilosis* clínico. O isolado clínico de *C. albicans* mostrou CIMB superior a 4000 µg/mL. A cepa padrão de *C. parapsilosis* apresentou uma CIMB de 500. O OE de *C. sinensis* demonstrou em isolados de *C. krusei* clínico, CIMB de 250 µg/mL. A cepa padrão de *C. albicans* teve CIM de 1000 µg/mL, e o isolado clínico de *C. albicans*, maior que 4000 µg/mL. O isolado de *C. parapsilosis* ATCC 22019 teve CIMB acima de 4000 µg/mL, enquanto o isolado clínico CIMB de 2000 µg/mL.

Nos ensaios de MTT (Tabela 2), que avaliam a viabilidade das células fúngicas, o OE de *O. vulgare* mostrou uma CIM de 2000 µg/mL para as cepas padrão e clínica de *C. albicans*, e para o isolado *C. parapsilosis* ATCC 22019, enquanto o isolado clínico de *C. parapsilosis* mostrou CIM superior a 4000 µg/mL. Ambas as cepas de *C. krusei* apresentou CIM de 1000 µg/mL. O óleo essencial de *Citrus sinensis* também apresentou atividade variável, com CIM de 2000 µg/mL para a cepa ATCC de *C. albicans* e de 4000 µg/mL para o isolado clínico. A CIM de *C. krusei* foi de 500 µg/mL para a cepa ATCC e 1000 µg/mL para o isolado clínico. Os isolados de *C. parapsilosis* apresentaram CIMs de 1000 µg/mL e 2000 µg/mL para a cepa ATCC e o isolado clínico, respectivamente.

Com os fármacos Anfotericina B e Fluconazol (Tabela 2), nos ensaios com Cristal Violeta apresentou como resultado em todos os isolados uma CIM 1 µg/mL exceto *C. parapsilosis* isolado clínico que resultou em 2 µg/mL para Anfotericina B e todas as cepas >64 para Fluconazol.

Nos ensaios com MTT (Tabela 2), os fármacos apresentou como resultado uma CIM de 0,5 µg/mL para *C. krusei* ATCC e *C. albicans* clínico, 0,25 µg/mL para a cepa ATCC de *C. krusei*, 1 µg/mL para ambas as cepas de *C. parapsilosis* e 2 µg/mL na cepa ATCC de *C. albicans* com a Anfotericina B. O Fluconazol apresentou uma CIM de 1 µg/mL no isolado clínico de *C. parapsilosis*, 4 µg/mL na *C. parapsilosis* ATCC, 64 para a cepa ATCC de *C. krusei* e >64 nos isolados clínicos de *C. albicans* e *C. krusei* e na cepa ATCC de *C. albicans*.

4. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais têm sido amplamente pesquisados nos últimos anos e apresentam potencial como uma alternativa complementar no tratamento de infecções causadas por espécies de *Candida*, especialmente aquelas superficiais e mucocutâneas (Lima *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2021). Este estudo avaliou a atividade *in vitro* dos OEs de *Origanum vulgare* e *Citrus sinensis* contra espécies do gênero *Candida* por meio da determinação da concentração inibitória mínima do crescimento, concentração fungicida mínima e concentração inibitória mínima da formação do biofilme.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais está relacionada à composição química deles. Assim, diversos fatores influenciam a sua composição, como a região de origem da planta, o local e as condições de cultivo, variações sazonais, diferenças fenotípicas e a parte específica da planta utilizada para a extração do óleo. Essas diferenças tornam-se ainda mais significativas ao comparar OEs de espécies diferentes dentro de um mesmo gênero. Além disso, a eficácia dos OEs pode ser afetada diretamente pela predominância de certos compostos químicos presentes em sua composição, quando se compara diferentes quimiotipos (Singh *et al.*, 2020; Tsai *et al.*, 2017).

Estudos recentes demonstram que o OE de *O. vulgare* apresenta atividade antifúngica promissora contra diversas espécies de *Candida*, incluindo cepas resistentes. Pesquisa publicada em 2023 mostrou que ele foi capaz de inibir fatores de virulência de *C. albicans*, como a adesão celular (CIM de 0,25 mg/mL), degradação de biofilmes (CIM de 0,4 mg/mL) e produção de fosfolipase extracelular, enzima associada à patogenicidade fúngica (Cid-Chevecich *et al.*, 2022). Outro estudo reportou eficácia do *O. vulgare* contra 16 isolados de *Candida*, com CIM entre 2,10 e 2,97 µL/mL, e identificou como principais compostos ativos o 4-terpineol (47,95%), o carvacrol (9,42%) e o timol (8,42%) (Sartoratto *et al.*, 2023). Esses constituintes fenólicos são responsáveis por desestabilizar a membrana celular fúngica, promovendo alterações na permeabilidade e perda de componentes intracelulares, além de interferirem em processos como morfogênese e formação de biofilmes, essenciais para a virulência de *Candida* spp. (Silva *et al.*, 2022).

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram o papel do *O. vulgare* como uma fonte promissora de compostos com propriedades antifúngicas. O OE dessa espécie apresentou eficácia variável contra diferentes espécies de *Candida* com uma atividade antifúngica contra o isolado clínico de *C. krusei* (CIM = 125 µg/mL). Essa observação

está alinhada com estudos prévios que atribuem o efeito anticandida ao carvacrol, um dos constituintes majoritários desse OE, extraordinariamente reconhecido por sua ação antimicrobiana (Fernandes *et al.*, 2023;). A variabilidade química mencionada pode explicar as diferenças na CIM entre as espécies, e mesmo entre isolados da mesma espécie. Esses dados reforçam o potencial do *O. vulgare* em aplicações clínicas, particularmente no tratamento de infecções por *C. krusei*.

Estudos indicam que os componentes principais do óleo, como o limoneno, têm propriedades que podem comprometer a integridade da membrana celular do fungo, levando à inibição de crescimento (Hou; Huang, 2024). A capacidade do óleo de alterar a permeabilidade da membrana e causar vazamento de conteúdo intracelular explica sua eficácia. Esses efeitos foram demonstrados em experimentos *in vitro*, com resultados promissores para aplicações terapêuticas (Hou; Huang, 2024; Thakre *et al.*, 2018).

O OE de *O. vulgare* tem demonstrado forte atividade antifúngica, especialmente contra *Candida albicans*, devido ao seu alto teor de compostos fenólicos como carvacrol e timol, que possuem potentes propriedades antimicrobianas. Estudos destacam a superioridade do óleo de orégano no combate a fungos, corroborando a sua alta potência antifúngica. Esses resultados são consistentes com a literatura, que reconhece o óleo essencial de *O. vulgare* como uma opção promissora para o tratamento de infecções fúngicas (Etebu; Nwauzoma, 2014).

O OE *O. vulgare* apresentou atividade antifúngica superior em relação ao *C. sinensis* em relação a *C. albicans* (Tabela 1). A concentração inibitória mínima do óleo de laranja contra *C. albicans* foi consideravelmente elevada para a cepa padrão (2000 µg/mL) e ainda mais alta para o isolado clínico (>4000 µg/mL), diminuindo a potência antifúngica do óleo de laranja em comparação ao de orégano. Esses valores são significativamente maiores que os coletados para o OE de orégano, refletindo sua menor potência.

Essas diferenças podem ser atribuídas à composição química. O limoneno, predominantemente no OE de laranja doce, exerce um efeito mais moderado sobre a membrana celular dos fungos (Hou; Huang, 2024), enquanto o carvacrol e o timol apresentam um espectro mais amplo e uma ação mais agressiva na desestabilização das membranas e na inibição de enzimas essenciais ao metabolismo fúngico (Fernandes *et al.*, 2023).

Além de *C. albicans*, o OE de *C. sinensis* foi testado contra outras espécies de *Candida*, revelando uma sensibilidade maior em *C. krusei* (CIM de 250 µg/mL), isso é particularmente relevante, pois *C. krusei* apresenta resistência intrínseca aos azóis, uma classe de antifúngicos frequentemente utilizada no tratamento de infecções fúngicas, e para *C. parapsilosis* (CIM de 1000 µg/mL). Essas diferenças podem estar relacionadas à variabilidade estrutural das membranas dessas espécies e à sua suscetibilidade aos efeitos do limoneno. Estudos anteriores (Novais *et al.*, 2023; Etebu; Nwauzoma, 2014) confirmam que o limoneno apresenta maior eficácia contra fungos com menor capacidade de formação de biofilmes, como *C. krusei*. Embora menos potente em comparação com compostos como carvacrol, o limoneno apresenta mecanismos claros de ação antifúngica. Ele atua aumentando a permeabilidade da membrana fúngica e induzindo estresse oxidativo. No entanto, a sua eficácia depende da concentração utilizada e da resistência intrínseca de cada isolado. Os valores elevados de CIM para *C. albicans* observados nos isolados clínicos (>4000 µg/mL) indicam um resultado menor de *C. sinensis* por esses fungos mais resistentes, o que limita seu uso isolado como antifúngico (Novais *et al.*, 2023).

Esses resultados indicam que os óleos essenciais, especialmente o de laranja doce, apresentam atividade relevante frente a isolados resistentes ao fluconazol, e reforçam o potencial terapêutico desses compostos naturais como alternativas ou adjuvantes no tratamento de infecções por *Candida* spp.

Os resultados obtidos nos ensaios de inibição da biomassa e viabilidade celular (Tabela 2) indicam diferenças na eficácia dos OEs contra as espécies de *Candida*. Na inibição da biomassa, o OE de *O. vulgare* apresentou melhor atividade frente a *C. parapsilosis* ATCC 22019 (500 µg/mL), enquanto o OE de *C. sinensis* foi mais eficaz contra o isolado clínico de *C. krusei* (250 µg/mL). O carvacrol, presente no *O. vulgare* possui uma camada lipofílica maior, o que facilita sua ação sobre a integridade do biofilme (Fernandes *et al.*, 2023; Kolypetri *et al.*, 2023). Por outro lado, o limoneno do *C. sinensis* é menos eficaz na desorganização de biofilmes maduros, o que se reflete nas diferenças observadas nos CIMBs (Singh *et al.*, 2020)

No que diz respeito a inibição da viabilidade celular do biofilme (Tabela 2), os resultados mostraram que *O. vulgare* mostrou maior eficácia contra *C. krusei* isolado clínico e cepa padrão (1000 µg/mL). Por outro lado, o OE de *C. sinensis* foi mais eficiente

contra *C. krusei* ATCC 6258 (500 µg/mL), mas apresentou menor resultado contra o isolado clínico de *C. albicans*.

A variabilidade dos resultados entre isolados clínicos e cepas padrão reflete a complexidade das infecções fúngicas e destaca a importância de estudos adicionais para compreender melhor os mecanismos de ação dos antifúngicos. Enquanto as cepas padrão são geneticamente estáveis e amplamente caracterizadas, os isolados clínicos apresentam perfis variáveis devido a fatores como pressão seletiva do hospedeiro e resistência adquirida (Silva-Rocha *et al.*, 2014). Essas diferenças podem influenciar a eficácia de compostos antifúngicos. Estudos adicionais são essenciais para avaliar a real aplicabilidade de novas terapias, considerando não apenas sua eficácia em laboratório, mas também sua relevância clínica. A investigação dessas diferenças pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias mais eficazes no combate às infecções fúngicas, garantindo uma abordagem terapêutica mais precisa e eficiente (Silva *et al.*, 2022).

O estudo apresenta resultados promissores sobre a atividade antifúngica dos OEs de *O. vulgare* e *C. sinensis*, mas também revela algumas limitações. Primeiramente, a ausência de uma avaliação específica da concentração mínima necessária para a erradicação ou rompimento do biofilme limita o entendimento completo da eficácia dos OEs, como biofilmes mais resistentes a agentes antimicrobianos. Embora o ensaio de cristal violeta tenha fornecido informações relevantes sobre a prevenção de biofilmes, uma abordagem mais detalhada que inclui o rompimento completo dessas estruturas seria crucial para fortalecer os achados.

Além disso, não foram realizados testes *in vivo* para validar os resultados obtidos *in vitro*. Isso reduz a aplicabilidade imediata dos dados em cenários clínicos, uma vez que as condições do ambiente biológico podem influenciar significativamente a eficácia dos compostos testados. A inclusão de experimentos em modelos animais ou humanos seria importante para confirmar a relevância dos óleos essenciais como potenciais adjuvantes terapêuticos.

Outro ponto que merece atenção é a ausência de análises combinadas entre os OEs e antifúngicos convencionais, como anfotericina B e fluconazol para potencializar sua eficácia.

Além disso, a evidência de alta variabilidade química entre amostras de OEs deve ser considerada, uma vez que impacta diretamente na reprodutibilidade e na aplicação clínica. Portanto, padronizações nas condições de cultivo das plantas de onde serão

extraídos os OEs aumentará a probabilidade de manutenção da composição química. Testes de sinergia de OEs com antifúngicos convencionais podem ser sugestões para investigações futuras.

CONCLUSÃO

Este estudo mostra o potencial antifúngico dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* e *Citrus sinensis*, na inibição do crescimento e da formação de biofilme, contra diferentes espécies de *Candida*, com destaque para *C. krusei* e *C. parapsilosis*. *C. sinensis* apresentou maior eficácia geral, especialmente contra biofilmes e para *C. krusei*. *O. vulgare* demonstrou eficácia mais modesta na prevenção de formação biofilmes. Esses óleos essenciais oferecem uma abordagem promissora e complementar frente à resistência antifúngica, especialmente no contexto de infecções mucocutâneas e associadas a biofilmes. Os OEs demonstraram significativa atividade fungicida contra diferentes espécies de *Candida*. O destaque foi para *C. krusei*, frente à qual o óleo essencial de *C. sinensis* apresentou a melhor atividade antifúngica, demonstrando-se eficaz tanto contra a cepa padrão quanto contra o isolado clínico.

REFERÊNCIAS

- ABRÃO, F. Y. *et al.* Atividade *in vitro* de fluconazol e itraconazol em biofilmes de *Candida albicans*. **Latin American Journal of Development**, Curitiba, v. 3, n. 5, p. 3172–3186, Set-Out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.46814/lajdv3n5-036>.
- AGARWAL, V.; LAL, P.; PRUTHI, V. Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. **Mycopathologia**, Berkeley, v. 165, n. 1, p. 13-19, Jan. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11046-007-9077-9>.
- AL-FATTANI, M.A.; DOUGLAS L.J. Penetration of *Candida* biofilms by antifungal agents. **Antimicrob Agents Chemother.**, Washington, v. 48, n. 9, p. 3291-3297, Sep. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.48.9.3291-3297.2004>.
- AKARCA, G.; SEVIK, R. Biological activities of *Citrus limon* L. and *Citrus sinensis* L. peel essential oils. **Journal of Essential Oil-Bearing Plants**, London, v. 24, n. 6, p. 1415-1427, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1080/0972060X.2021.2022000>.
- BHATTACHARYA, S.; SAE-TIA, S.; FRIES, B. C. Candidiasis and mechanisms of antifungal resistance. **Antibiotics**, Basel, v. 9, n. 6, p. 312, June 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9060312>.

BONA, E. *et al.* Sensitivity of *Candida albicans* to essential oils: are they an alternative to antifungal agents? **J Appl Microbiol.**, Oxford, v. 121, n. 6, p. 1530 a 1545m Dec. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/jam.13282>

CAVALHEIRO, MAFALDA; TEIXEIRA, MIGUEL CACHO. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. **Frontiers in Medicine**, v. 5, p. 28, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00028>.

CHEN, Y. *et al.* Dill (*Anethum graveolens* L.) seed essential oil induces *Candida albicans* apoptosis in a metacaspase-dependent manner. **Fungal Biol.**, Amsterdam, v. 118, n. 4, p. 394-401, Apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.funbio.2014.02.004>.

CID-CHEVECICH C. *et al.* *Origanum vulgare* L. essential oil inhibits virulence patterns of *Candida* spp. and potentiates the effects of fluconazole and nystatin *in vitro*. **BMC Complement Med Ther.**, London, v. 22, n. 1, p. 39, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12906-022-03518-z>.

CZECHOWICZ, P.; NOWICKA, J.; GOŚCINIAK, G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 23, n. 11, p. 5895, May 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23115895>.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard-M27Ed4E. **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2017.

CZECHOWICZ, P.; NOWICKA, J.; GOŚCINIAK, G. Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 23, n. 11, p. 5895, May 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms23115895>.

D'AGOSTINO M. *et al.* Essential oils and their natural active compounds presenting antifungal properties. **Molecules**, Basel, v. 24, n. 20, p. 3713, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules24203713>.

ETEBU, E.; NWAUZOMA, A. B. A Review on Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck): Health, Diseases and Management. **American Journal of Research Communication**, v. 2, n. 2, p. 33–70, 2014. Disponível em: https://www.usa-journals.com/wp-content/uploads/2014/01/Etebu_Vol22.pdf.

FAVELA-HERNÁNDEZ, J. M. J.; GONZÁLEZ-SANTIAGO, O.; RAMÍREZ-CABRERA, M. A.; ESQUIVEL-FERRIÑO, P. C.; CAMACHO-CORONA, M. del R. Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. **Molecules**, v. 21, n. 2, p. 247, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules21020247>

FELIX, T.C. *et al.* Evaluation of vulvovaginitis and hygiene habits of women attended in primary health care units of the family. **Int J Womens Health**, Auckland, v. 12, p. 49-57, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.2147/IJWH.S229366>.

FERNANDES, LILIANA DE SOUSA. Essential oils as an alternative therapeutic strategy against *Candida* species: focus on vapor-phase application. **Dissertação**

(Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Minho, Braga, 2023.

Disponível em:

<https://repositorium.sdum.uminho.pt/bitstream/1822/93521/1/Liliana%20de%20Sousa%20Fernandes.pdf>.

HAWSER S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials *in vitro*. **Infect Immun.**, Bethesda, v. 62, n. 3, p. 915-921, Mar. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.62.3.915-921>.

HOU, G.-W.; HUANG, T. Essential oils as promising treatments for treating *Candida albicans* infections: research progress, mechanisms, and clinical applications. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, p. 1400105, 2024. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2024.1400105>

KADOSH, D.; MUNDODI, V. A re-evaluation of the relationship between morphology and pathogenicity in *Candida* species. **J. Fungi**, Basel, v. 6, n. 1, p. 13, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof6010013>.

KONG, A.S-Y. *et al.* Anti- and pro-oxidant properties of essential oils against antimicrobial resistance. **Antioxidants**, Basel, v. 11, n. 9, p. 1819, Sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/antiox11091819>.

KOVÁCS, R.; MAJOROS, L. Fungal quorum-sensing molecules: a review of their antifungal effect against *Candida* biofilms. **J Fungi**, Basel, v. 6, n. 3, p. 99, Jul. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof6030099>.

KROM, B.P. *et al.* Optimized *Candida* biofilm microtiter assay. **J Microbiol Methods**, Amsterdam, v. 68, n. 2, p. 421-423, Feb. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2006.08.003>.

KUMAR, D.; KUMAR, A. Molecular determinants involved in *Candida albicans* biofilm formation and regulation. **Mol Biotechnol.**, Totowa, v. 66, n. 7, p. 1640–1659, Jul. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12033-023-00796-x>.

LIMA, I. D. O. *et al.* Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 16, n. 2, p. 197-201, jun.2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2006000200011>.

LIN, H. *et al.* Limonene: promising and sustainable natural bioactive compound. **Applied Sciences**, Basel, v. 14, n. 11, May 2024. DOI: <https://doi.org/10.3390/app14114605>.

LOMBREA, A. *et al.* A recent insight regarding the phytochemistry and bioactivity of *Origanum vulgare* L. essential oil. **Int J Mol Sci**, Basel, v. 21, n. 24, p. 9653, Dec. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21249653>.

MALINOVSKÁ, Z.; ČONKOVÁ, E.; VÁCZI, P. Biofilm formation in medically important *Candida* species. **J Fungi**, Basel, v. 9, n. 10, p. 955, Sep. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof9100955>.

MARCOS-ZAMBRANO, L. J. *et al.* Production of biofilm by *Candida* and non-*Candida* spp. isolates causing fungemia: comparison of biomass production and metabolic activity and development of cut-off points. **Int J Med Microbiol**, Jena, v. 304, n. 8, p. 1192-1198, Nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.08.012>.

MAKLED, A. F. *et al.* Characterization of *Candida* species isolated from clinical specimens: insights into virulence traits, antifungal resistance and molecular profiles. **BMC Microbiol.**, London, v. 24, n. 1, p. 388, Oct. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12866-024-03515-x>.

MANZUR M, LUCIARDI MC, BLÁZQUEZ MA, ALBERTO MR, CARTAGENA E, ARENA ME. *Citrus sinensis* essential oils an innovative antioxidant and antipathogenic dual strategy in food preservation against spoilage bacteria. antioxidants. **Basel**. 2023 Jan 21;12(2):246. DOI: 10.3390/antiox12020246.

MIJATOVIC, S. *et al.* Antifungal activity of *Lavandula angustifolia* essential oil against *Candida albicans*: time-kill study on pediatric sputum isolates. **Molecules**, Basel, v. 27, n. 19, p. 6300, Sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27196300>.

MUKHERJEE, P. K. *et al.* Mechanism of Fluconazole resistance in *Candida albicans* biofilms: phase-specific role of efflux pumps and membrane sterols. **Infect Immun.**, Bethesda, v. 71, n. 8, p. 4333-4340, Aug. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.71.8.4333-4340.2003>.

MUTLU-İNGÖK, A.; KARA, S.; KARA, H.; et al. Essential oils: The science of extraction and its implications for composition and biological activity—a review. **Food Analytical Methods**, v. 13, p. 1–22, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11483-020-01552-2>.

NOVAIS, M. H. G., FARIAS, N. S., DOS SANTOS, A. G., FONSECA, V. J. A., RIBEIRO-FILHO, J., DE MENEZES, I. R. A., COUTINHO, H. D. M., & MORAIS-BRAGA, M. F. B. Pharmacological potential of limonene against opportunistic fungi: Impact on *Candida* virulence. **Acta tropica**. 2024 may; 253:107168. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2024.107168>

PALMER, Gary E. *Candida albicans* biofilms: pathogenesis and drug resistance. **Current Clinical Microbiology Reports**, Cham: Springer, v. 11, n. 1, p. 1–10, 2024. DOI: 10.1007/s40588-024-00239-1.

PÉRMAN, J.; CANTÓN, E.; VALENTIN, A. Actividad de la anidulafungina sobre biopelículas de *Candida*. **Iberoam Micol.**, Barcelona, v. 25, n. 2, p. 124-128, Jun. 2008. DOI: [https://doi.org/10.1016/s1130-1406\(08\)70030-5](https://doi.org/10.1016/s1130-1406(08)70030-5).

RAMAGE, G.; BORGHI, E.; RODRIGUES, C. F.; KEAN, R.; WILLIAMS, C.; LOPEZ-RIBOT, J. Our current clinical understanding of *Candida* biofilms: where are we two decades on? **APMIS**, v. 131, n. 1, p. 1–19, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1111/apm.13310>

RATHER, P. N.; CHEN, J.; LI, Y.; et al. Biofilm matrixome: Extracellular components in structured microbial communities. **Trends in Microbiology**, v. 28, n. 6, p. 465–478, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2020.03.016>.

ROMO, J. A.; KUMAMOTO, C. A. On commensalism of *Candida*. **J Fungi**, Basel, v. 6, n. 1, Jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof6010016>.

SAGATOVA, A. A.; KENIYA, M. V.; WILSON, R. K.; MONK, B. C.; TYNDALL, J. D. Structural insights into binding of the antifungal drug fluconazole to *Saccharomyces cerevisiae* lanosterol 14 α -demethylase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 59, n. 8, p. 4982–4989, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/AAC.01131-18>.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp. **Revista Brasileira de Microbiologia**, v. 54, n. 1, p. 1–8, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2022.10.004>.

SCANDORIEIRO, S. *et al.* Synergistic and additive effect of oregano essential oil and biological silver nanoparticles against multidrug-resistant bacterial strains. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 7, p. 760, May 2016. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00760>.

SIDDIQUI, Z. N. *et al.* Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. **Journal of Saudi Chemical Society**, Riyadh, v. 17, n. 2, p. 237–243, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jscs.2011.03.016>.

SILVA, R. A. *et al.* Essential oils of *Melaleuca*, *Citrus*, *Cupressus*, and *Litsea* for the management of infections caused by *Candida* species: a systematic review. **Pharmaceutics**, Basel, v. 13, n. 10, Oct. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13101700>.

SILVA, R. A. *et al.* Combining essential oils with each other and with clotrimazole prevents the formation of *Candida* biofilms and eradicates mature biofilms. **Pharmaceutics**, Basel, v. 14, n. 9, p. 1872, Sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091872>.

SILVA-ROCHA, W. P.; ALMEIDA-PAES, R.; MUNIZ, M. M.; MEDEIROS, S. S.; ZANETTE, M. P.; QUEIROZ-TELLES, F.; LACAZE, H. R.; DOS SANTOS, D. A.. Comparative analysis of virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida albicans* isolates from bloodstream and oropharyngeal candidiasis. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 1–11, 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00001>.

SINGH, B. *et al.* Phenolic composition, antioxidant potential and health benefits of citrus peel. **Food Research International**, Ottawa, v. 132, p. 109114, Jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109114>.

SOUSA, D. P. *et al.* Essential oils: chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, Basel, v. 13, n. 7, p. 1144, Jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/biom13071144>.

TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans* - The virulence factors and clinical manifestations of infection. **J Fungi**, Basel, v. 7, n. 2, p. 79, Jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/jof7020079>.

THAKRE, A.; JADHAV, V.; KAZI, R.; SHELAR, A.; PATIL, R.; KHARAT, K.; ZORE, G.; KARUPPAYIL, S. M. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**, v. 56, n. 5, p. 565–578, 2018. DOI: 10.1093/mmy/myx074.

TOLKER-NIELSEN, T. Biofilm development. **Microbiol Spectr.**, Washington, v. 3, n. 2, p. MB-0001-2014, Apr. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014>.

TRINDADE, L. A. *et al.* The antifungal and antibiofilm activity of *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal on clinical strains of *Candida albicans*. **Braz J Microbiol.**, Rio de Janeiro, v. 53, n. 3, p. 1231-1240, Sep. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s42770-022-00740-2>.

TSAI, M. L. *et al.* Composition and bioactivity of essential oil from *Citrus grandis* (L.) Osbeck 'Mato Peiyu' Leaf. **Molecules**, Basel, v. 22, n.13, p. 2154, Dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22122154>.

ZHANG, X. L. *et al.* Phenolic compounds from *Origanum vulgare* and their antioxidant and antiviral activities. **Food Chemistry**, Barking, v. 152, p. 300-306, June 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.11.153>.

ZHAO, A.; SUN, J.; LIU, Y. Understanding bacterial biofilms: from definition to treatment strategies. **Front Cell Infect Microbiol.**, Lausanne, v. 13, p. 1137947, Apr. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1137947>.