



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

PEDRO HENRIQUE LIMA RODRIGUES

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cinnamomum verum* J.Presl CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans
SENSÍVEIS E RESISTENTES A FLUCONAZOL

SOBRAL-CE

2026

PEDRO HENRIQUE LIMA RODRIGUES

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cinnamomum verum J.Presl CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans*
SENSÍVEIS E RESISTENTES A FLUCONAZOL**

Dissertação apresentada ao mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará (UFC) como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: BIOLOGIA MOLECULAR E DE MICRORGANISMO.

Orientadora: Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle.

Coorientadora: Dra. Francisca Lidiane Linhares de Aguiar.

SOBRAL-CE

2026

PEDRO HENRIQUE LIMA RODRIGUES

CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cinnamomum verum J.Presl CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans*
SENSÍVEIS E RESISTENTES A FLUCONAZOL

Dissertação apresentada ao mestrado em Ciências da
Saúde da Universidade Federal do Ceará (UFC) como
requisito parcial para obtenção do Título de Mestre
em Ciências da Saúde. Área de concentração:
BIOLOGIA MOLECULAR E DE
MICROORGANISMO.

Aprovada em __/__/2026.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle – Orientadora
Universidade Estadual Vale do Acaraú – (UVA)

Dra. Francisca Lidiane Linhares de Aguiar - Co-orientadora
Universidade Estadual Vale do Acaraú – (UVA)

Dra. Maria Gleiciane Soares Coutinho - 1º Examinador
Universidade Estadual Vale do Acaraú – (UVA)

Dr. Filipe Nobre Chaves - 2º Examinador
Universidade Federal do Ceará – (UFC)

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por toda saúde, paciência, força e coragem, e por me permitir chegar até aqui.

Agradeço à minha mãe, Antonia Lopes Barros, por ser minha maior amiga e referência de amor, apoio e incentivo. Obrigada por sempre me animar nos momentos de dificuldade, por me encorajar a estudar e aproveitar ao máximo todas as oportunidades.

Aos meus familiares, especialmente meus irmãos, agradeço pelo suporte constante, pelas conversas sérias ou descontraídas, em especial minha irmã Lisandra Rodrigues, por sempre me motivar a buscar o melhor, além de toda a ajuda durante o percurso acadêmico.

Agradeço à minha orientadora, Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, por aceitar me orientar e por todo apoio, paciência e ensinamentos. Sou grato pelo exemplo de pesquisadora/orientadora, pessoa, mãe e amiga que ela representa.

Agradeço à minha coorientadora, Profa. Dra. Lidianne Linhares de Aguiar, por aceitar conduzir comigo o meu trabalho de pesquisa, por me orientar e por todo apoio, paciência e ensinamentos. Sou grato pelo exemplo de pesquisadora, pessoa e além de tudo uma grande amiga.

Agradeço aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia- LABMIC (UVA), pela parceria e convivência diária. Um agradecimento especial à minha grande amiga e colega de turma, dupla na bioprospecção, Alyce Albuquerque, por tornar cada experiência de laboratório mais leve e motivo de celebração e por dividir todos os perrengues.

Agradeço ao coordenador professor Dr. César Barbosa e aos meus colegas do Laboratório de Microbiologia e Parasitologia- LAMP (UFC) por toda ajuda e parceria diária. Em especial minha amiga e técnica laboratorial, Flávia Silva, por toda gentileza, amizade e pelo suporte emocional e nutricional nos dias de experimentos corridos e duradouros.

Gratidão aos meus colegas de turma/jornada, Lídia França e Abrahão Lincoln, por tornarem o processo mais leve e por toda palavra de conforto e empatia.

Agradecimentos à Universidade Federal do Ceará (UFC)- *Campus* Famed e ao PPGCS pelo apoio institucional e acadêmico.

Agradeço à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro durante o desenvolvimento desta pesquisa, por meio da concessão da

bolsa de estudos durante 12 meses, que possibilitou a dedicação integral ao meu trabalho e contribuiu de forma significativa para meu crescimento acadêmico e científico.

Meu mais sincero e profundo agradecimento a todos que, de alguma forma, fizeram parte dessa trajetória.

“A vida é muito curta. Seja grato e feliz, siga seus impulsos de felicidade e o resto se resolverá depois.”
(Ariana Grande)

RESUMO

O número de casos por infecções fúngicas invasivas tem aumentado nos últimos anos. Dentre os patógenos responsáveis por essas infecções destacam-se os do gênero *Candida*, leveduras oportunistas principais responsáveis por casos de infecções fúngicas sistêmicas. Nesse sentido, os estudos com plantas aromáticas como *Cinnamomum verum* J.Presl, conhecido como caneleira-verdadeira, destaca-se por apresentar atividade antimicrobiana. Diante disso, esse estudo teve como objetivos caracterizar e determinar a atividade antifúngica do óleo essencial de *Cinnamomum verum* J. Presl contra *Candida albicans*. Para tanto foi realizada a extração do óleo essencial por hidrodestilação no aparelho tipo Clevenger. A atividade antimicrobiana foi realizada por microdiluição em caldo, enquanto que o sinergismo foi executado pelo método *Checkerboard*. Foram feitas a atividade antibiofilme e o efeito hemolítico do óleo essencial. Também foi realizado o perfil de inibição de virulência por meio de enzimas hidrolíticas e verificação do mecanismo de ação por meio do ergosterol e sorbitol. A atividade do óleo essencial demonstrou CIM de 2,5 mg/mL contra ATCC 90028 e as demais cepas de isolados clínicos e CIM de 1,25 mg/mL para a cepa de isolado clínico resistente C14. O *Checkerboard* mostrou um efeito aditivo para ambas as cepas testadas com a combinação de Anfotericina B e o O.E de ICIF = 0,75 para ATCC 90028 e ICIF = 1 para a cepa C16, já o efeito combinatório entre Fluconazol e o OE apresentou ICIF = 0,63 para ATCC 90028 definido como aditivo e ICIF = 0,37 para cepa C16 com efeito sinérgico. O composto apresentou efeito sobre a inibição da adesão do biofilme, semelhante ao Fluconazol e Anfotericina B, no entanto, não apresentou erradicação do biofilme maduro. O efeito hemolítico foi menor comparado ao dos dois antifúngicos testados, onde o óleo apresentou a maior CL_{50} na concentração de 7,56 mg/mL. O óleo essencial modulou a atividade das enzimas hidrolíticas, em especial na cepa ATCC 90028. O mecanismo de ação do óleo não demonstrou ser pelo ergosterol e nem sorbitol, indicando interferência de processos metabólicos ou ação na integridade da parede celular. Essas atividades enfatizam a importância do uso de produtos naturais e seus compostos para a busca de novas terapias antimicrobianas.

Palavras-chaves: Canela. Infecções fúngicas. Produtos naturais. Resistência.

ABSTRACT

The number of invasive fungal infections has increased in recent years, with *Candida* species standing out as opportunistic yeasts and major causative agents of systemic mycoses. In this context, aromatic plants such as *Cinnamomum verum* J.Presl (true cinnamon) have attracted attention due to their antimicrobial properties. Therefore, this study aimed to characterize and determine the antifungal activities of *Cinnamomum verum* essential oil against *Candida albicans*. The essential oil was obtained by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus. Antifungal activity was evaluated by broth microdilution, and synergistic interactions were assessed using the checkerboard method. Antibiofilm activity and hemolytic effects were also determined. Additionally, the inhibition profile of virulence factors was analyzed through hydrolytic enzyme assays, and the mechanism of action was investigated using ergosterol and sorbitol assays. The essential oil showed a minimum inhibitory concentration (MIC) of 2.5 mg/mL against ATCC 90028 and other clinical isolates, and 1.25 mg/mL against the resistant clinical isolate C14. Checkerboard assays revealed an additive effect for the combination of amphotericin B and essential oil (FICI = 0.75 for ATCC 90028 and FICI = 1.0 for C16). The combination of fluconazole and essential oil resulted in an additive effect for ATCC 90028 (FICI = 0.63) and a synergistic effect for C16 (FICI = 0.37). The essential oil inhibited biofilm adhesion similarly to fluconazole and amphotericin B but did not eradicate mature biofilms. Hemolytic activity was lower than that observed for the antifungals tested, with the essential oil showing the highest HC50 at 7.56 mg/mL. The oil modulated hydrolytic enzyme activity, particularly in strain ATCC 90028. Its mechanism of action was not associated with ergosterol or sorbitol pathways, suggesting interference with metabolic processes or cell wall integrity. These findings highlight the potential of natural products and their constituents in the search for new antimicrobial therapies.

Key-words: Cinnamon. Fungal infections. Natural products. Resistance.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Cinnamomum verum</i>	11
Figura 2. Curva de morte de <i>Candida albicans</i> ATCC 90028 (a) e <i>Candida albicans</i> C16 (b) tratadas com óleo essencial de <i>C.verum</i> , anfotericina B e Fluconazol.....	25
Figura 3. Atividade antibiofilme no processo de adesão e biofilme maduro/formado do O.E, Anfotericina B e do Fluconazol.....	27
Figura 4. Efeito do óleo essencial de <i>C. verum</i> sobre enzimas hidrolíticas produzidas por <i>Candida albicans</i>	29
Figura 5. Atividade hemolítica do óleo essencial de <i>C. verum</i> e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol após 1 h de tratamento.....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Características físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie <i>Cinnamomum verum</i>	22
Tabela 2.	Composição química do óleo essencial de <i>Cinnamomum verum</i>	22
Tabela 3.	Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>C. verum</i> , Anfotericina B e Fluconazol contra <i>C. albicans</i>	24
Tabela 4.	Efeito combinatório do óleo essencial associado à anfotericina B e ao Fluconazol.....	26
Tabela 5.	Mecanismo de ação do óleo essencial de <i>C. verum</i> usando ergosterol 400 µg/mL e sorbitol a 0,8M.....	30

ABREVIACOES E ACRNIMOS

Abs	Absorbância
AMB	Anfotericina B
ATCC	American Type Culture Collection
CE	Ceará
CIM	Concentrao Inibitória Mínima
CFM	Concentrao Fungicida Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-Linked Immonosorbent Assay
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-Acético
FLC	Fluconazol
GC-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
ICIF	ndice de Concentrao Inibitória Fracionada
IFs	Infecções fúngicas
IR	ndice Refrativo
LABMIC	Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú
MOPS	cido 3-[N-Morfolino] propanosulfnico
OEs	leos Essenciais
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
spp	Espécie

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Célsius
g	Gramma
mL	Mililitro
M	Massa
Mm	Milímetro
Mg	Miligramma
µg	Microgramma
µL	Microlitro
µM	Micrômetro
nM	Nanômetro
UFC	Unidades Formadora de Colônia
V	Volume
®	Marca registrada
%	Porcentagem
:	Proporção
>	Maior que
<	Menor que
=	Igual

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	7
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	9
2.1. Produtos naturais de origem vegetal.....	9
2.2. Óleos essenciais.....	9
2.3. Gênero <i>Cinnamomum</i>	10
2.4. <i>Cinnamomum verum</i>	11
2.5. <i>Candida albicans</i>	12
2.6. Mecanismos de resistência do gênero <i>Candida</i>	13
3. OBJETIVOS.....	15
3.1. Objetivo geral.....	15
3.2. Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
4.1. Material vegetal.....	16
4.2. Extração e composição química do óleo essencial.....	16
4.3. Microrganismos.....	17
4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	17
4.5. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	17
4.6 Curva de morte.....	18
4.7. <i>Checkerboard</i>	18
4.8. Quantificação total da biomassa do biofilme.....	19
4.9. Ensaio de enzimas hidrolíticas.....	19
4.10. Ensaio de mecanismo de ação por sorbitol e ergosterol.....	20
4.11. Atividade hemolítica.....	21
4.12. Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
5.1. Características do Óleo Essencial.....	22
5.2. Atividade antimicrobiana.....	24
5.3. Curva de morte.....	25
5.4. <i>Checkerboard</i>	26
5.5. Atividade antibiofilme.....	27
5.6. Enzimas hidrolíticas.....	28

5.7. Mecanismo de ação por sorbitol e ergosterol.....	30
5.8. Atividade Hemolítica.....	30
6. CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33
ANEXO I- Artigo de revisão submetido ao <i>Archives of Current Research International</i>	42
ANEXO II- Artigo experimental a ser submetido <i>Planta Medica</i> (Fator de impacto 2.1)	58

1. INTRODUÇÃO

Candida é um fungo comum e frequentemente encontrado nos ambientes hospitalares, sendo principal microrganismo causador de infecções emergente e infecções invasivas, se tornando mais prevalentes em pacientes neonatos prematuros, com procedimentos cirúrgicos, imunocomprometidos ou em situação de estado grave nas unidades de tratamento intensivo, sendo responsável por altas taxas de morbimortalidade (Araújo *et al.*, 2024; Silva 2024; Santos *et al.*, 2024).

Cerca de 46,3% dos casos de candidíase invasivas são causadas por *Candida albicans*, enquanto 53,7% corresponde à outras espécies de *Candida*. Essas infecções vem se tornando cada vez mais difíceis de tratar por conta de diversos fatores, sendo o biofilme um dos principais, além disso o desenvolvimento de diversos mecanismo de resistência às diferentes classes de antifúngicos utilizados no meio clínico, como azólicos, políenos e equinocandinas, apresentando mutações em diversos genes, sendo EGR 11 principal pela codificação da lanosterol, bombas de efluxo como ABC e MFS, e alterações na composição dos constituintes da membrana pelo ergosterol (Mallick *et al.*, 2025; Gaffar *et al.*, 2025; Li Y, 2025).

Recentemente, o interesse em produtos de origem vegetal, especialmente OEs, aumentou devido às suas potentes propriedades antimicrobianas (Abers *et al.*, 2021). São produtos naturais, líquidos e voláteis, originários dos conhecidos metabólitos secundários das plantas, que tem como principal característica atuar na defesa e interação com o ambiente. No geral os óleos essenciais apresentam dois ou três compostos principais, podendo estar presente em concentrações de 20% a 90% (Porrello *et al.*, 2025; Nath *et al.*, 2024). Da caneleira, bem como de diversas outras plantas, é possível obter óleos, frequentemente denominados óleos etéreos. Por seu aroma marcante, são referidos como essências (Butnariu, 2018). Amplamente utilizada na medicina popular, na forma de chá e infusão e também diversas práticas culinárias por ser uma especiaria que agrega muito sabor e aroma a diversos pratos (Charles Spence, 2024).

Uma das principais propriedades atribuídas a *Cinnamomum verum* é a capacidade de inibir o estresse oxidativo, por possuir ação antioxidante (Pagliari, 2023). Além disso, estudos apresentam que o óleo essencial possui uma ação antifúngica significativa contra espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*. dificultando a formação de biofilmes e diminuindo a viabilidade das células fúngicas associadas a essas estruturas, o que é importante, já que esses fatores contribuem diretamente para o surgimento e a persistência das infecções. Entre outras atividades biológicas estão antidiabética, anti-inflamatória, anticolinérgica e antimicrobiana

(Mamdouh, 2022; Assaggaf, 2025; Kim NY *et al.*, 2023; Wijesinghe *et al.*, 2021; Wijesinghe *et al.*, 2020; Pagliari, 2023).

Atualmente, são imprescindíveis pesquisas que confirmem a eficácia do potencial antimicrobiano de produtos naturais e que investiguem o arsenal químico proveniente do metabolismo secundário das plantas na busca de compostos que possam ser utilizados no combate a infecções fúngicas causadas por microrganismos resistentes. Portanto, esse estudo se propõe caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. verum*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos naturais de origem vegetal

Frequentemente, as plantas medicinais são empregadas por comunidades tradicionais para prevenção, alívio e cura de certas enfermidades, esta utilização antiga ocorre devido à busca constante de recursos naturais alternativos para melhoria da qualidade de vida. (Andrade *et al.*, 2022). Extratos de plantas e óleos essenciais têm sido usados há muito tempo como agentes antifúngicos seguros e eficazes. Apresentam uma grande variedade de compostos, já que são oriundos dos chamados metabólitos secundários das plantas, que participam da autodefesa contra patógenos (Castro *et al.*, 2020).

Nesse sentido, extratos e óleos essenciais obtidos de plantas vêm sendo testados para diversas aplicações, como no controle de insetos, ação larvicida, efeito antimicrobiano entre outros, isso em virtude de sua elevada seletividade, degradação à produtos não tóxicos ou de baixa toxicidade. Esses produtos naturais, contêm na sua composição fitoquímica compostos que fazem parte do processo de defesa das plantas, com isso podendo ser manipulados para diversas finalidades em diversas áreas do mercado e da indústria (Rezende *et al.*, 2020; Berlink *et al.*, 2017).

Os produtos naturais podem apresentar bons resultados em relação a aplicação na saúde, no entanto sua utilização requer alguns cuidados e atenção às suas limitações em uso/armazenamento, já que são vulneráveis ao calor, assim como também podem ser a frio intenso, excesso de umidade e estarem sujeitos a processos de mudança na sua estrutura física ou química por conta de processos de oxidação entre outros, tendo ligação na mudança de suas atividades biológicas (Silva *et al.*, 2018; Lourenço, 2007).

2.2. Óleos essenciais

Recentemente, o interesse em produtos fitoterápicos, especialmente OEs, aumentou devido às suas potentes propriedades antimicrobianas (Borges *et al.*, 2024). Produto derivado do metabolismo secundário das plantas, os óleos essenciais têm sido extensivamente estudados pelas suas propriedades de sabor e aromáticas, além de suas funções biológicas, atividades como antioxidante, anti-inflamatória, entre outras (Castro *et al.*, 2020; Casanova., 2017).

Essas substâncias são voláteis, possuem um aroma característico e são pouco solúveis em água. Elas desempenham funções biológicas essenciais para a sobrevivência das plantas, principalmente em mecanismos de defesa. Por exemplo, ajudam a proteger contra a radiação ultravioleta em excesso, além de atuar como barreira contra microrganismos, insetos e animais,

podendo ser encontradas nas mais diversas partes das plantas (Reis, 2020; Silva, 2019; Oliveira., 2019).

Os óleos essenciais são utilizados há décadas pelas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. Mais recentemente, eles vêm ganhando destaque como aromatizantes, flavorizantes e conservantes naturais na indústria de alimentos. Por suas propriedades antimicrobianas naturais, eles têm um grande potencial para inibir o crescimento dos microrganismos, reduzindo a necessidade de aditivos químicos. Além disso, ajudam a prevenir a contaminação em alimentos, melhoram as técnicas de conservação e prolongam a vida útil dos produtos, ao eliminar patógenos indesejáveis e retardar o processo de deterioração (Franco *et al.*, 2023; Fronza *et al.*, 2021).

A composição dos óleos essenciais pode variar, de uma composição totalmente diferente a uma composição com porcentagem distinta entre compostos, assim como suas atividades biológicas podem ser afetadas, essas características são dependentes de diversos fatores em que se encontra a planta e se realiza a coleta, desde a parte escolhida para extração dos óleos essenciais, como fatores físico-químicos do ambiente, por exemplo: temperatura, umidade, pluviosidade, o ambiente em que a planta está fincada, substrato, disponibilidade de sombra ou luminosidade total (Jesus *et al.*, 2024; Silva *et al.*, 2019; Alves *et al.*, 2015).

2.3. Gênero *Cinnamomum*

Cinnamomum é um gênero pertencente à família Lauraceae. Trata-se de plantas que apresentam durante o seu desenvolvimento porte arbustivo e arbóreo, abrangendo aproximadamente 250 espécies distribuídas em áreas tropicais e subtropicais do Sudeste Asiático, Austrália, América do Norte, Central e do Sul. A *C. verum* (Sin. *Cinnamomum zeylanicum* Blume, *Laurus cinnamomum* L.). É uma planta nativa predominantemente cultivada no Sri Lanka, Índia e nas ilhas de Seychelles e Madagascar (Castro *et al.*, 2020; Silva, 2020; Coutinho *et al.*, 2018).

Conhecida em todo o mundo como canela, é notável pela sua vasta aplicação na culinária de várias culturas (Kzam *et al.*, 2022). Além de ter grande importância para a indústria de processamento de alimentos, possui diversas propriedades farmacológicas como por exemplo: aromáticas, estimulantes, digestivas, antibacterianas, antifúngicas, antihelmínticas, anti-inflamatórias, analgésicas e antioxidantes (Moreira *et al.*, 2023; Raj *et al.*, 2018).

Os óleos e fluidos extraídos tanto da casca interna seca como das folhas de *Cinnamomum* spp. possuem uma composição química complexa, que varia conforme a espécie, a parte escolhida para realizar a extração, local de coleta, umidade do ambiente, período de

coleta e o método de extração. Entre os principais componentes estão o cinamaldeído, responsável pelo aroma característico da canela, o ácido cinâmico, a cumarina, os polímeros de linalol, o eugenol e o cariofileno, cada um contribuindo para as propriedades aromáticas e terapêuticas desses extratos (Mendes, 2019; Barros *et al.*, 2019)

A espécie chegou ao Brasil durante a época da escravidão, sendo comumente referida como Canela, Canela-da-Índia ou Canela-do-Ceilão. É comumente usada como estimulante, tônico, carminativo e antiespasmódico. O gênero *Cinnamomum*, inclui quatro espécies de extrema importância no mercado mundial: a canela do Ceilão (*Cinnamomum verum*, sin. *C. zeylanicum*), a canela da China (*C. cassia*), a canela de Saigon (*C. loureiroi*) e a canela da Indonésia, também conhecida como canela Padang (*C. burmannii*) (Okamura *et al.* 2019; Oliveira *et al.*, 2018).

2.4. *Cinnamomum verum*

A espécie *C. verum* pode atingir uma altura de 10 a 15 metros. Suas folhas são opostas, ovais a oblongas, sem pelos e geralmente têm uma textura firme e coriácea em ambas as faces. As folhas, de cor verde-escura, medem entre 8 e 17 cm de comprimento e possuem pontas afiadas. A parte inferior da folha tem uma tonalidade branco-esverdeada, enquanto a parte superior é verde brilhante (Figura 1) (Ferreira *et al.*, 2019; Silva, 2018).



Figura 1. *Cinnamomum verum* J. Presl. Fonte: Próprio Autor, (2026)

C. verum é uma fonte rica e diversificada de fitocompostos. O óleo essencial dessa espécie contém uma variedade de classes de compostos, como monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos, hidrocarbonetos oxigenados entre outros (Bezerra *et al.*, 2024; Mota, 2017). O extrato e o O.E da casca de canela apresentam mais comumente compostos como *trans-*

cinamaldeído, ácido cinâmico (Mota, 2017; Souza *et al.*, 2022). Destaca-se o eugenol (70–95%) como o principal componente do óleo essencial (EO) das folhas de canela (Ferreira *et al.*, 2019). Já Nabavi *et al.* (2015) identificaram o acetato de cinamil (*E*) como o principal composto presente no óleo essencial das frutas e flores de canela (Kzam *et al.*, 2022).

Diferentes partes da planta de canela e seu óleo essencial (EO) são amplamente utilizados como temperos e condimentos para realçar o sabor de especiarias, molhos, produtos de panificação, doces e bebidas, sendo a casca e a entrecasca as principais partes utilizadas. Além disso, eles são adicionados como aditivos alimentares em diversos produtos, graças à sua capacidade de preservar alimentos (Schwanke *et al.*, 2024; Silva, 2018; Oliveira, 2018).

2.5. *Candida albicans*

O gênero *Candida* pertence ao reino Fungi, sendo classificado no filo Ascomycota. Ele está incluído na classe Saccharomycetes e faz parte da família Saccharomycetaceae (Silva *et al.*, 2019). As leveduras, pertencentes ao gênero *Candida*, fazem parte da microbiota natural de pessoas saudáveis. Elas costumam colonizar principalmente o trato gastrointestinal, a boca, a pele e a mucosa genital (Alencar, 2021; Areal, 2015).

Qualquer mudança no sistema imunológico do hospedeiro pode levar a um desequilíbrio na microbiota, conhecido como disbiose, e, como consequência, resultar em manifestações clínicas mais graves. Por isso, esse gênero é composto por leveduras oportunistas, que afetam principalmente indivíduos com o sistema imunológico debilitado ou aqueles que fazem uso prolongado de antibióticos de amplo espectro (Soares *et al.*, 2023; Silva, 2021; Lima, 2021).

Elas podem afetar pessoas de ambos os sexos e em qualquer idade. Esses microrganismos são um dos principais causadores de infecções oportunistas em ambientes hospitalares. Os pacientes com maiores índices de risco de desenvolver candidíase invasiva (CI) são aqueles internados em Unidades de Terapia Intensiva (UTI), sendo também um dos principais causadores de infecção de corrente sanguínea causada por microrganismo no meio hospitalar, indivíduos que passaram por procedimentos cirúrgicos, pacientes com câncer, recém-nascidos prematuros e outros pacientes com o sistema imunológico comprometido e portadores de doenças autoimunes (Fernandes *et al.*, 2021; Bezerra *et al.*, 2015; Giolo, 2010). Essas doenças ocorrem porque a maioria das infecções causadas por esse tipo de fungo está relacionada à formação de biofilmes em superfícies do corpo do hospedeiro ou em dispositivos médicos, o que resulta em altas taxas de morbidade e mortalidade.

A *Candida albicans* é uma espécie polimórfica, ou seja, pode assumir diferentes formas. Pode aparecer como uma levedura circular achatada ou de forma ovóide, identificada tal forma

de blastoconídio, ou então se desenvolver como pseudohifas e hifas verdadeiras (Campos *et al.*, 2020; Hashizume *et al.*, 2018). Um ponto importante é que os biofilmes formados por *C. albicans* possuem hifas e pseudohifas o que promove uma maior aderência e sustentação à superfície na qual se fixa e são naturalmente resistentes a tratamentos antifúngicos. Por isso, a eficácia dos agentes terapêuticos atuais contra esses biofilmes continua sendo limitada (Pereira *et al.*, 2021; Soares *et al.*, 2018; Bezerra *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2022).

C. albicans é intrinsecamente sensível às classes de antifúngicos, mas desenvolveu mecanismos de resistência e atualmente essa espécie é relatada apresentando resistência adquirida aos antifúngicos usados na prática clínica, principalmente aos derivados azólicos. Isso dificulta o tratamento das infecções e, muitas vezes, resulta em desfechos clínicos desfavoráveis (Nour *et al.*, 2024; Santos *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2021; Paz *et al.*, 2021).

2.6. Principais mecanismos de resistências

Dentro da prática clínica tem-se com utilidade ampla três principais classes de antimicóticos, sendo essas os azóis, equinocandinas e os polienos (Lv QZ *et al.*, 2016). Distinguindo-se não apenas pela estrutura química, mas também pelos diferentes alvos celulares de ação frente a célula fúngica, sendo de suma importância para a eficácia terapêutica, atuando diretamente sobre processos fundamentais para a manutenção da viabilidade e da integridade estrutural (Salazar *et al.*, 2020; Houst *et al.*, 2020).

Os azóis constituem a maior família de antifúngicos, agem na inibição da atividade da enzima lanosterol-14 α -desmetilase (codificada pelo gene ERG11). A resistência aos azólicos em espécies de *Candida* está frequentemente associada a alterações na enzima lanosterol 14 α -desmetilase. Mutações que reduzem a afinidade do fármaco pelo alvo e a superexpressão de bombas de efluxo ABC e MFS-MDR, comprometendo sua ação. Como consequência, a biossíntese de ergosterol é parcialmente mantida, preservando a integridade da membrana celular fúngica (Sharma *et al.*, 2024; Houst *et al.*, 2020; Lv QZ *et al.*, 2016).

Os polienos tem como alvo a ligação direta ao ergosterol presente na membrana plasmática fúngica e subsequentemente instabilidade na distribuição, levando a formação de poros que possibilitam o extravasamento do conteúdo celular. Tendo Anfotericina B como principal representante e escolha no tratamento de infecções sistêmicas (Sharma *et al.*, 2024). A resistência aos polienos em espécies de *Candida*, ainda que relativamente rara, está associada a alterações na composição lipídica da membrana, especialmente à redução ou modificação do conteúdo de ergosterol. Mutações em genes da via de biossíntese de esteróis, como ERG3 e ERG11, resultando na substituição do ergosterol por outros esteróis com menor afinidade pelos

polienos, diminuindo sua eficácia. Como consequência, reduzindo o efeito fungicida característico apresentado por essa classe de antifúngicos (Salazar *et al.*, 2020; Czajka *et al.*, 2023).

As equinocandinas são a classe de antifúngicos que atuam na inibição da enzima β -1,3-glucano sintase, essencial para a síntese de β -glucanas da parede celular fúngica (Czajka *et al.*, 2023). A resistência está associada a mutações nos genes FKS1 e FKS2, reduzindo a afinidade do fármaco pelo seu alvo. Essas alterações comprometem a eficácia do antifúngico, permitindo a continuidade da síntese de glucanas. Como consequência, a integridade da parede celular é parcialmente mantida, diminuindo a suscetibilidade ao efeito antifúngico dessa classe (Sharma *et al.*, 2024; Salazar *et al.*, 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antifúngico e investigar a composição química e mecanismo de ação do óleo essencial de *Cinnamomum verum* J.Presl contra cepas de *Candida albicans* sensíveis e resistentes ao Fluconazol, tanto na forma planctônica como na forma de biofilme.

3.2. Objetivos específicos

- Investigar a composição química do óleo essencial de *C. verum*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *C. verum* contra cepas de *C. albicans* de isolados clínicos sensíveis e resistentes a Fluconazol;
- Avaliar o efeito modulatório do óleo essencial *C. verum* combinado com Fluconazol e Anfotericina B para determinar a interação das drogas;
- Investigar o potencial antibiofilme do óleo essencial de *C. verum*;
- Avaliar a cinética de morte do óleo essencial de *Cinnamomum verum*
- Avaliar o efeito do óleo essencial de *C.verum* sobre enzimas hidrolíticas;
- Investigar o mecanismo de ação por meio do ergosterol e sorbitol.
- Avaliar o perfil de hemólise do óleo essencial de *C. verum*;

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Material vegetal

As folhas da canela verdadeira foram coletadas no IV setor do Perímetro Irrigado Araras Norte, Coordenadas: 4° 09' de latitude Sul e 40° 32' de longitude Oeste – *C. verum* J. Presl e a exsicata foi depositada no Herbário Prof. Francisco José de Abreu Matos (HUVA) da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), onde foi taxonomicamente identificada com auxílio de literatura especializada e por comparação com materiais previamente incorporados ao acervo do HUVA. A exsicata está depositada com número de registro 26473.

4.2. Extração e composição química do óleo essencial

A extração do OE foi feita de acordo com Mehani (2023) com modificações, utilizando a hidrodestilação por 2h, em um aparelho dosador tipo Clevenger, onde o processo de obtenção do óleo se dá pela penetração de partículas de água no material vegetal efetuando o arraste de partículas de óleo, que se separam ao chegar no condensador e assim o óleo se deposita na parte graduada do Clevenger. Foram avaliadas as propriedades físicas como rendimento, densidade, cor e aparência. O rendimento do óleo foi calculado em função do volume final em mL dividido pela massa seca em gramas e multiplicado pelo fator de conversão em porcentagem. Para determinar a densidade, a massa do óleo em gramas foi dividida pelo volume do óleo em mL.

A análise química dos óleos essenciais (OE) foi realizada de acordo com Arantes *et al.* (2019), por cromatografia gasosa. As análises por CG-FID foram realizadas com um cromatógrafo gasoso Shimadzu Nexis GC 2030 com detector de ionização de chama (CG-FID) equipado com um injetor automático AOC-20i plus (Laboratório HERCULES, Univ. Évora, Portugal), com dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. e espessura do filme de 0,50 µm, e uma coluna capilar de sílica fundida não polar Zebron ZB 5HT Inferno™ (Phenomenex, EUA), utilizando o software LabSolutions versão 5.92 (Shimadzu Corporation). As análises de GC-MS foram realizadas com um cromatógrafo gasoso GC-MS-QP2010 Series (Shimadzu), equipado com sílica fundida não polar Zebron ZB-5HT Inferno™ (30 m × 0,25 mm d.i., espessura do filme 0,50 µm), acoplado a um detector modelo Polaris Q (quadrupolo E.I.). Os compostos foram identificados por seus índices de retenção (IR) e seus espectros de massa da biblioteca NIST11 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia). Os índices de retenção foram determinados por interpolação em relação aos tempos de retenção de n-alcanos C8–C22 e comparados com os de amostras autênticas, do banco de dados do laboratório e com dados da literatura (Babushok *et al.*, 2011; Arantes *et al.*, 2019; Pandur *et al.*, 2022).

4.3. Microrganismos

As cepas utilizadas nesse estudo foram 6 isolados clínicos de *Candida albicans* do Laboratório de Microbiologia – LABMIC (LABMIC 0102, LABMIC 0104, LABMIC 0105, LABMIC 0133, LABMIC C16 e LABMIC C14), provenientes da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, da Micoteca da UNILAB e da cepa padrão ATCC 90028 da *American Type Culture Collection*. As cepas foram previamente identificadas por Vitek, Chromoagar e biologia molecular.

4.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação do CIM do óleo essencial foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 poços em fundo U de acordo com CLSI, norma M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura usado foi o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), contendo glutamina, indicador de fenol em coloração avermelhada e ausência de bicarbonato. Os compostos foram diluídos a 10 mg/mL. O óleo foi diluído em RPMI e 5% de DMSO. Inicialmente foram adicionados 100 µl do RPMI em todos os poços, seguido de 100 µl dos compostos adicionados à primeira coluna. A partir disso foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 0,0097 mg/ml. A Anfotericina B (Sigma) foi utilizada como controle no intervalo de concentração de 16–0,0078 µg/ml. O Fluconazol (Medley) foi testado no intervalo de concentração de 64–0,032 µg/ml. Por fim, foi feita a suspensão do inóculo preparada de acordo a escala McFarland 0.5 (10^6 UFC/mL), seguido de uma diluição em RPMI de 1:2000 (2×10^2 UFC/mL). 100 µL do inóculo foram adicionados em todos os poços. Foram adicionados controles de crescimento do inóculo, controle de esterilidade do meio e um controle de turbidez dos compostos (composto sem inóculo). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a determinação da CIM do óleo essencial foi determinada a Concentração Fungicida Mínima de ambos os compostos.

4.5. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Na determinação da Concentração Fungicida Mínima foram retiradas alíquotas de 100 µL dos poços que não tiveram crescimento fúngico visível na microdiluição foram semeados em placas de meio de cultivo sabouraud dextrose agar (SDA). As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Após isso, a menor concentração que não apresentou crescimento de colônias foi a concentração fungicida mínima (Fontenelle *et al.*, 2007).

4.6 Curva de morte

O efeito fungicida do(s) agente(s) testado(s) sobre *Candida albicans* foi avaliado por meio do ensaio de curva de morte (time-kill). As cepas *C. albicans* utilizadas foram previamente mantidas em ágar Sabouraud a 36 °C por 24 h. A partir de colônias jovens, preparou-se uma suspensão em solução salina estéril, ajustada de acordo com a escala de MacFarland para aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células/mL e posteriormente diluída em RPMI 1640 tamponado (pH 7,0). As soluções dos agentes antifúngicos foram preparadas em solvente apropriado e diluídas no meio de cultura para alcançar concentração correspondente a CIM. Na placa de 96 poços com os compostos nas concentrações desejadas, adicionou-se o inóculo e considerou-se o tempo zero imediatamente após a inoculação. As culturas foram incubadas a 36 °C, e alíquotas de 100 µL foram coletadas nos tempos 0, 4, 8, 12, 24h. As diluições adequadas foram semeadas por espalhamento em ágar Sabouraud em duplicata e incubadas por 24 h a 36 °C. O número de células viáveis foi expresso em log (CFU/mL). (Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza, 2014). Os dados foram analisados estatisticamente por meio de média e desvio-padrão, com comparação entre tempos e tratamentos utilizando ANOVA seguida de teste post-hoc apropriado ($\alpha = 0,05$) (McHugh, Mary L. 2011).

4.7. Checkerboard

O efeito do composto combinado com antifúngico padrão foi determinado pela técnica do *Checkerboard*, método usado para determinar a interação dos fármacos através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF). O ICIF foi calculado pela adição da Concentração Inibitória Fracional (CIF) para cada um dos compostos ensaiados, sendo definida como a adição dos valores de CIM de cada fármaco na combinação e CIM do mesmo fármaco sozinho (Johnson *et al.*, 2004). Sendo utilizadas uma cepa padrão e um isolado clínico resistente para analisar e comparar o efeito combinatório.

A turbidez das suspensões fúngicas foi preparada e ajustada para 0,5 na escala McFarland (10^6 UFC/mL). Nas soluções utilizaram-se os produtos testados, nas concentrações dos seus respectivos valores de CIM, adicionou-se 50 µL do meio RPMI 1640 a todos os 96 poços da placa de microdiluição. Adicionaram-se, na primeira coluna 50 µL do óleo essencial, e em seguida, foram realizadas diluições em série na placa até a 10ª coluna, com a concentração do óleo essencial variando entre CIM e CIM/10. Nas linhas, na vertical, dispuseram-se de 50 µL dos antifúngicos padrões (Anfotericina B), em diferentes concentrações variando entre CIM e CIM/8. Por fim, 100 µL de inóculo são adicionados a todos os poços. Foi utilizado como controle negativo o meio RPMI 1640 com o inóculo. Como controle positivo foi utilizado as

CIM do antifúngico padrão e do óleo essencial separadamente. Os ensaios realizaram-se em duplicata. O efeito foi definido como sinérgico quando o índice ICIF for $<$ ou $= 0,5$, efeito aditivo com $ICIF > 0,5$ e $<$ ou $= 1,0$, indiferente com $ICIF > 1,0$ e $<$ ou $= 4,0$ e antagonismo com $ICIF > 4,0$ (Johnson *et al.*, 2004).

4.8. Quantificação total da biomassa do biofilme

Utilizada a técnica de cristal violeta para quantificar a biomassa total de biofilme, onde foi disposto em placa de poliestireno de fundo chato uma alíquota de 100 μ l de suspensão fúngica. Depois foram adicionados 100 μ l dos tratamentos de cada composto nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM, também foram adicionados controles de crescimento, em seguida a placa foi incubada a 37°C por 48 h (Processo de anti-adesão). Para o biofilme maduro, foram adicionados 200 μ l do inóculo a placa de poliestireno e incubada por 48 h. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes com 200 μ l de solução salina e foram adicionados os tratamentos de cada composto nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM. A placa foi incubada a 37°C por 24 h. Após os períodos de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 200 μ l de solução salina para remover células planctônicas. Para fixação do biofilme, foram adicionados 200 μ l de metanol (99%) por um período de 10 min. Com as placas já secas em temperatura ambiente, foi adicionado 200 μ l de cristal violeta a 1% (M/V) por um período de 10 min. E em seguida, as placas foram lavadas 3x com água destilada estéril. Para dissolver o corante presente nas células aderidas foram utilizados 200 μ l de ácido acético a 33% (V/V) por 10 min. O conteúdo foi transferido para uma nova placa e a leitura foi realizada em espectrômetro a 590 nm. E a porcentagem de inibição de formação do biofilme para cada concentração foi calculada de acordo com a fórmula: % de inibição do biofilme = $100 - (OD \text{ da amostra tratada} / OD \text{ do controle positivo não tratado}) \times 100$ (Taff *et al.*, 2012).

4.9. Ensaio de enzimas hidrolíticas

Os ensaios foram realizados em concentrações subinibitórias (1/4 CIM) do óleo essencial de *C. verum* e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol sobre a secreção de proteinases, fosfolipases, e hemolisinas das cepas de *C. albicans*. Foram utilizadas uma cepa de referência sensível (ATCC 90028) a fluconazol e um isolado clínico resistente a fluconazol (C16). As suspensões foram ajustadas a 0,15 no espectrofotômetro a 520 nm em PBS. As células foram incubadas por 30 min a 37° C após os tratamentos. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 3.000 g por 10 min, em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS. As células foram inoculadas em SDA suplementado

com diferentes substratos para detectar cada tipo de enzima. Para as proteinases, o meio SDA foi suplementado com 1 g de albumina de soro bovino (BSA, Biosera, Nuaille, Pays de la Loire—França). Para fosfolipase, o SDA foi preparado com 29,22 g NaCl + 0,28 g de CaCl₂, e suplementado com emulsão de gema de ovo (1:10 v/v). A atividade de hemolisina foi determinada utilizando SDA (Sabouraud Dextrose agar- Himedia) suplementado com 3% de glicose (p/v) e 7% de sangue de carneiro (v/v). As placas suplementadas foram incubadas a 37 °C por 5 dias para proteinase, 3 dias para fosfolipase e 48 h para hemolisina. A atividade enzimática (Pz) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia da levedura e o diâmetro total da zona de precipitação (colônia + zona de precipitação). A atividade enzimática foi classificada em 5 grupos: (Pz= 1) sem atividade, (0,90 > Pz ≤ 0,99) atividade fraca, (0,80 > Pz ≤ 0,89) atividade suave, (0,70 > Pz ≤ 0,79) atividade moderada, (Pz ≤ 0,69) atividade potente (Price, Wilkinson, Gentry 1982; Oliveira *et al.*, 2016; Canela *et al.*, 2018).

4.10. Ensaio de mecanismo de ação por sorbitol e ergosterol

Os ensaios de sorbitol e ergosterol são métodos utilizados para determinar o mecanismo de ação de novos agentes antifúngicos contra *Candida* spp. O sorbitol atua como um protetor osmótico da parede celular, onde um aumento na Concentração Inibitória Mínima (CIM) sugere interferência na síntese de β-1,3-glucana. Enquanto que, o ergosterol exógeno reverte a inibição se o agente se liga a ele nas membranas. Para o ambos os ensaios, as CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas) foram determinadas para a cepa ATCC 90028 na ausência e presença de ergosterol (400 µg/mL) e sorbitol (0,8M). Foi utilizado o controle Caspofungina para o ensaio do sorbitol e Anfotericina B para o ensaio do ergosterol. Um valor de CIM inalterado (comparado ao grupo controle) na presença de sorbitol demonstra que o composto não tem como alvo a parede, e, portanto, a presença do sorbitol é irrelevante. Por outro lado, um aumento na CIM na presença de sorbitol indica que o óleo essencial tem como alvo a parede celular.

Já o aumento da CIM na presença do ergosterol, indica que o composto se liga ao ergosterol exógeno, enquanto valores inalterados de CIMs indicam que o mecanismo não está relacionado à ligação ao ergosterol. Os valores de CIM foram determinados utilizando o método de microdiluição em triplicata, descrito anteriormente. Concomitantemente, foram preparados controles de esterilidade do meio de cultura (RPMI) e de viabilidade da cepa (RPMI + 3% DMSO + 2% Tween 80 + leveduras) (Escalante *et al.* 2008).

4.11. Atividade hemolítica

Usando tubos de EDTA, 10 ml de sangue humano fresco foram coletados de um doador (número de aprovação do comitê de ética 6.662.155), e centrifugados a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. Após a remoção do plasma, o sedimento contendo os glóbulos vermelhos (RBCs) foi lavado cinco vezes com PBS e, em seguida, foi novamente suspenso em PBS para obter uma solução com 8% (v/v) de eritrócitos. Foram adicionadas alíquotas de 100 µL desta suspensão em tubos de microcentrifuga, contendo 100 µl óleo diluídos seriadamente, com concentrações variando de 0,01 a 20 mg/ml. Para Anfotericina B foram usados as concentrações de 30 a 250 µg/mL e para Fluconazol as concentrações de 1,5 a 6 mg/mL. As concentrações finais dos eritrócitos foram de 4% (v/v). Estas suspensões foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 1 h a 37°C. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes foram transferidos para placas de microdiluição de 96 poços, e a liberação de hemoglobina foi medida por absorbância a 540 nm. Foram utilizados Triton X-100 a 1% e 4% (v/v) de RBCs em PBS sem os óleos essenciais (não tratados) como controles positivo e negativo, respectivamente. O percentual de hemólise foi calculado como $[(\text{Abs } 540 \text{ nm tratado} - \text{Abs } 540 \text{ nm não tratado}) / (\text{Abs } 540 \text{ nm } 1\% \text{ Triton X-100} - \text{Abs } 540 \text{ nm não tratado})] \times 100$ e os experimentos foram realizados em triplicata (Cavalcante *et al.*, 2017).

4.12. Análise estatística

Os dados coletados neste estudo foram apresentados na forma de média aritmética, desvio padrão, gráficos, tabelas e imagens. Alguns dados ainda foram submetidos as análises estatísticas utilizando o software GraphPad® Prism versão 5, 4 para Windows (GraphPad software, San Diego California USA). Adotando o nível de significância de 0,05 ($p \leq 0,05$).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Características do Óleo Essencial

A tabela 1 mostra as características físicas do óleo essencial extraído das folhas da canela coletadas no período de agosto de 2023. Observou-se no decorrer do processo de extração que o óleo não se mantinha por muito tempo acima da superfície d'água dentro do tubo graduado do aparelho dosador Clevenger, após certo tempo ele precipitava e depositava-se no fundo do tubo. Isso ocorreu porque o óleo apresenta densidade maior que a da água. Esse fenômeno foi também observado e brevemente descrito no estudo de Dias e colaboradores (2009), onde as propriedades químicas foram semelhantes às encontradas neste estudo.

Tabela 1. Características físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Cinnamomum verum*.

Características físicas	Óleo essencial
Densidade (g/ml)	1,3
Rendimento (%)	0,20
Cor	Levemente amarelado
Aparência	Límpido

Tais valores podem sofrer variações atribuídas a diversos fatores como à diferença de época de colheita/coleta, tipo e composição de solo, clima da região, umidade relativa do ar, no dia da coleta/colheita (Cheng *et al.*, 2024). Esses fatores têm impacto direto na composição química e nas propriedades biológicas de ação dos constituintes do óleo essencial.

O óleo essencial obtido por meio de hidrodestilação das folhas de *C. verum* apresentou um perfil químico dominado pelo benzoato de benzila (93,6%), enquanto compostos foliares comumente encontrados como terpenoides e fenólicos (eugenol 0,37%, cinamaldeído 0,97% e linalol 1,94%) estiveram presentes em pequenas porcentagens, indicando um quimiotipo foliar atípico e raro, dentro da diversidade de quimiotipos para as folhas da espécie *C. verum*.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *Cinnamomum verum*

Classe compostos	RI	Ret. Time	Nome	Área			
				Injeção 1	Injeção 2	Média	DP
MH	930	14,105	α -pineno	0,320	0,321	0,321	0,001
MH	942	15,031	Camphene	0,220	0,223	0,222	0,002
MH	970	16,978	β -Pinene	0,229	0,257	0,243	0,020
MH	1024	20,817	p-Cimene	0,255	0,256	0,256	0,001

MO	1031	21,314	1,8-Cineol	0,191	0,190	0,191	0,001
MO	1100	26,248	Linalol	1,946	1,935	1,941	0,008
MO	1139	29,088	Canfora	0,134	0,135	0,135	0,001
MO	1160	30,719	Isomentona	0,656	0,652	0,654	0,003
MO	1174	31,611	Terpineno-4-ol	0,136	0,138	0,137	0,001
MO	1188	32,603	α -Terpineol	0,249	0,251	0,250	0,001
MO	1264	38,01	Cinamaldeido	0,970	0,965	0,968	0,004
MO	1300	40,50	Acetato de cinamilo	0,180	0,175	0,178	0,004
MO (fenólico)	1356	43,747	Eugenol	0,375	0,373	0,374	0,001
SH	1415	47,041	Beta-cariofileno	0,152	0,153	0,153	0,001
SO	1575	54,411	Oxido de cariofileno	0,186	0,182	0,184	0,003
SO	1580	54,633	Calarene	0,220	0,217	0,219	0,002
O	1770	61,974	Benzoato de benzila	93,580	93,575	93,578	0,004

Classe dos compostos		Área			
		Injeção 1	Injeção 2	Média	DP
MH	Hidrocarbonetos monoterpênicos	1,02	1,06	1,04	0,02
MO	Monoterpenos oxigenados	4,84	4,81	4,83	0,02
SH	Hidrocarbonetos sexquiterpênicos	0,15	0,15	0,15	0,00
SO	Sexquiterpenos oxigenados	0,41	0,40	0,40	0,00
O	Outros Compostos fenólicos	93,58	93,58	93,58	0,00
	Total	100,0	100,0	100,0	0,1

Embora o quimiotipo foliar de *C. verum* seja comumente caracterizado pela presença de eugenol, a literatura descreve a existência de outro quimiotipo do óleo essencial das folhas, no qual o benzoato de benzila é o composto majoritário. Exemplos coletados em Santa Inês-MA apresentaram 95,3% de benzoato de benzila no óleo essencial das folhas (Farias *et al.*, 2020), um perfil químico semelhante ao observado neste estudo. Em contrapartida, outro estudo apresenta o cinamaldeído (35,6%) e eugenol (18,69%) como os principais constituintes do óleo essencial das folhas de *C. verum*, com benzoato de benzila representando somente 0,25% da composição total (Narayanankutty *et al.*, 2021). Essas diferenças estão associadas a condições ambientais, como estresse ambiental sofrido, condições climáticas extremas da região nordeste, e fatores físicos como poda indevida.

5.2. Atividade antimicrobiana

O óleo essencial de *C. verum* apresentou CIM entre 2,5 e 1,25 mg/mL para todos os isolados, inclusive para os resistentes a fluconazol (Tabela 3). O óleo apresentou efeito fungicida para todas as cepas testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antifúngica do óleo essencial de *C. verum*, Anfotericina B e Fluconazol contra *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>	Óleo essencial μg/mL		Anfotericina B μg/mL		Fluconazol μg/mL	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 90028	2,5	10	1,0	1,0	1	4
LABMIC 0102	2,5	10	0,5	0,5	1	8
LABMIC 0104	2,5	10	0,5	0,5	1	4
LABMIC 0105	2,5	10	0,5	0,5	1	4
LABMIC 0133	2,5	10	1,0	1,0	2	8
LABMIC C 16*	2,5	10	0,125	0,125	16	64
LABMIC C14*	1,25	5,0	0,125	0,125	8	32

*Cepas resistentes de acordo com os pontos de corte do EUCAST (<http://clincalc.com/eucast/>) e CLSI (Performance standards for antifungal susceptibility of yeasts, 1st Ed. CLSI supplement M60. ISBN 1-56238 – 828 – 2 [Print]) que estabelecem CIM > 4 μg.ml⁻¹ para cepas de *C. albicans* resistente a fluconazol.

Efeito antifúngico superior foi obtido por Wijesinghe e colaboradores (2021), que encontraram CIMs nos valores de 1 mg/mL do óleo essencial das folhas contra *Candida albicans* e não-*albicans*. No entanto, as relações de CIM/CFM divergiram do nosso estudo, onde os autores encontraram relação de 1/2 de CIM/CFM e nosso estudo 1/4. Essa diferença pode ser justificada também pela composição, onde o estudo de Wijesinghe e colaboradores (2021) obtiveram um óleo com 77,22% de eugenol e somente 4,53% de benzoato de benzila. Portanto, a ação antifúngica pode variar de acordo com o quimiotipo do óleo essencial de *C. verum*. Embora esse seja o primeiro relato de atividade anti-*Candida* do quimiotipo benzoato de benzila, estudo anterior mostrou que o quimiotipo eugenol apresenta maior atividade antifúngica em relação ao quimiotipo benzoato de benzila quando testado contra o fitopatógeno *Colletotrichum musae* (Farias *et al.*, 2020).

5.3. Curva de morte

Para avaliação do tempo de ação dos compostos foi realizada a cinética de morte (Figura 2). Esse experimento determinou o tempo mínimo necessário para que o óleo essencial de *C. verum* promovesse a inativação ou morte das células planctônicas viáveis de *C. albicans*.

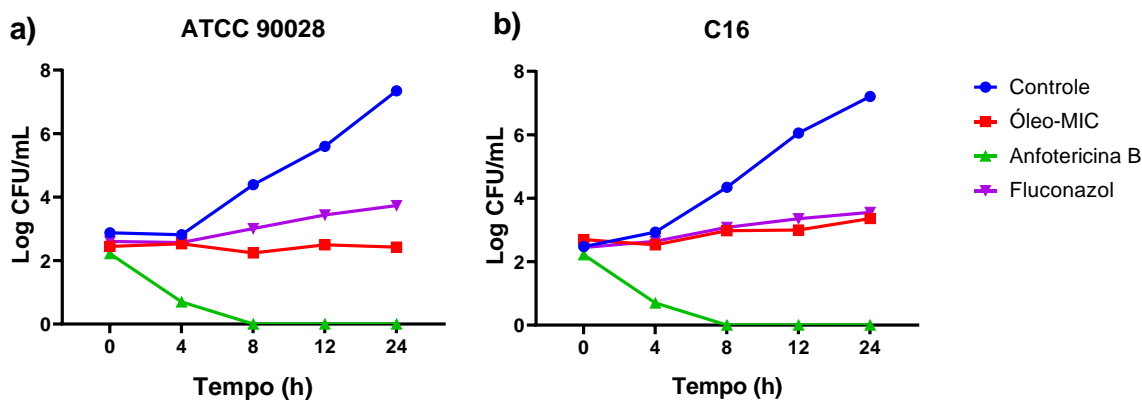


Figura 2. Curva de morte de *Candida albicans* ATCC 90028 (a) e *Candida albicans* C16 (b) tratadas com óleo essencial de *C. verum*, anfotericina B e Fluconazol.

De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial de *C. verum* não eliminou 100% das células de *C. albicans*, podendo observar no gráfico que óleo manteve o crescimento celular estável ao longo de 24 horas, demonstrando controle no desenvolvimento celular evitando a fase logarítmica e mantendo ambas as cepas na fase estacionária, em comparação controle celular sem tratamento, apresentando efeito de caráter fungistático, característica observada no Fluconazol. Em contrapartida, Anfotericina B reduziu rapidamente os níveis de células viáveis após 4 horas, atingindo 100% na redução de crescimento no período de 8 horas de ação, confirmando o mecanismo rápido de ação do fármaco, que consiste na ligação ao ergosterol da membrana, com formação de poros que levam ao extravasamento do conteúdo celular.

Segundo o estudo de Wijesinghe e colaboradores (2021), no período de 6 horas houve redução de 100% de viabilidade das células de *C. albicans* utilizando o óleo de *C. verum* na concentração de 2 mg/ml. Os autores verificaram também danos na parede e extravasamento de material intracelular por microscopia nas células tratadas com o quimiotipo eugenol. No entanto, a literatura carece de estudos de mecanismos relacionados ao quimiotipo benzoato de benzila.

5.4. Checkerboard

Para avaliação do efeito combinatório do óleo com a Anfotericina B e o Fluconazol foi utilizado o método *checkerboard* que consiste em combinações de diferentes concentrações de ambos os compostos com objetivo de diminuir as concentrações inibitórias de um ou ambos os compostos. O óleo essencial de *C. verum* combinado com Anfotericina B apresentou efeito aditivo com ICIF de 0,75 para a cepa padrão ATCC 90028, onde a CIM (1 µg/mL) individual da Anfotericina B reduziu pela 2x chegando a concentração de (0,25 µg/mL) quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu pela metade quando combinado, reduzindo a CIM de 2,5 à 1,25 mg/mL, o óleo essencial de *C. verum* combinado com Fluconazol apresentou efeito aditivo com ICIF de 0,63 para a cepa padrão ATCC 90028, onde a CIM individual da Fluconazol reduziu pela metade de 1 µg/mL e chegando a concentração de 0,5 µg/mL quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu 6x quando combinado reduzindo a CIM de 2,5 para 0,312 mg/ml (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito combinatório do óleo essencial associado à Anfotericina B e ao Fluconazol.

Cepas	<i>Cinnamomum verum</i>		Anfotericina B		ICIF	Efeito
	CIM mg/mL (Individual)	CIM mg/mL (Combinado)	CIM µg/mL (Individual)	CIM µg/mL (Combinado)		
LABMIC C16	2,5	1,25	0,125	0,0312	0,75	Aditivo
ATCC 90028	2,5	1,25	1	0,25	0,75	Aditivo

Cepas	<i>Cinnamomum verum</i>		Fluconazol		ICIF	Efeito
	CIM mg/mL (Individual)	CIM mg/mL (Combinado)	CIM µg/mL (Individual)	CIM µg/mL (Combinado)		
LABMIC C 16	2,5	0,312	16	4	0,37	Sinérgico
ATCC 90028	2,5	0,312	1	0,5	0,63	Aditivo

Óleo essencial de *C. verum* combinado com Anfotericina B apresentou efeito aditivo com ICIF de 0,75 para a cepa resistente C16, onde a CIM individual da Anfotericina reduziu 4x de 0,125 para 0,0312 µg/mL quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu 1x quando combinado reduzindo a CIM de 2,5 à 1,25 mg/mL. Óleo essencial de *C. verum* combinado com Fluconazol apresentou efeito sinérgico com ICIF de 0,37 para a cepa resistente LABMIC C16, onde a CIM individual do Fluconazol reduziu 4x a CIM, que saiu de 16 µg/mL para concentração de 4 µg/mL quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu 6x quando combinado.

A cepa LABMIC C16 apresenta resistência ao Fluconazol, e o efeito sinérgico observado indica que o óleo, por sua vez, possa atuar na sensibilização da membrana plasmática, promovendo a redução de fatores como o gradiente eletroquímico, que tem importante função para o funcionamento das bombas de efluxo. Em decorrência dos danos causados pelo óleo, podem favorecer acúmulo intracelular de Fluconazol, restaurando sua eficácia (Keereedach P *et al.*, 2020)

5.5. Atividade antibiofilme

Além de avaliar células planctônicas, o efeito do óleo essencial de *C. Verum* na adesão de biofilmes também foi investigado. Compostos capazes de inibir essa fase inicial são de grande relevância, pois impedem ou reduzem a porcentagem de adesão e consequentemente a formação de biofilmes. O EOCV demonstrou um efeito antiaderente significativo no biofilme de *C. albicans*, inibindo 89,7% da biomassa do biofilme da cepa ATCC 90028 em uma concentração de 4x CIM e reduzindo 76,4% da biomassa na concentração de 2x CIM e 75,9% no valor da CIM (Figura 3).

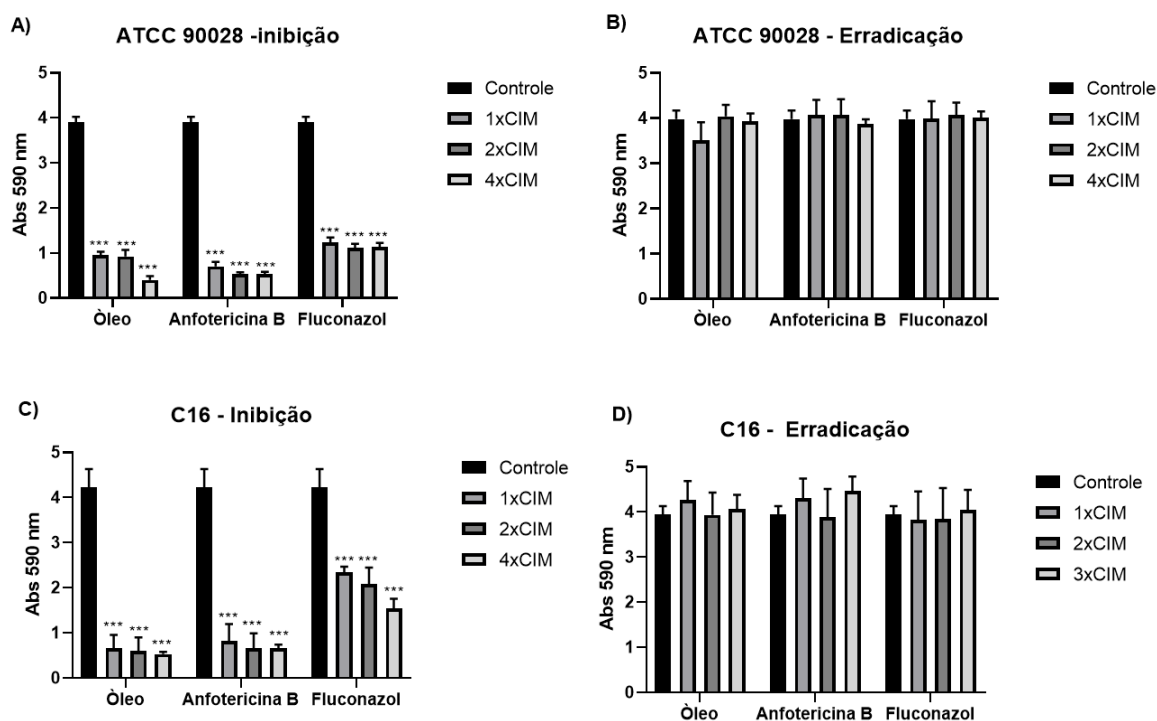


Figura 3. Atividade antibiofilme no processo de adesão e biofilme maduro/formado do O.E, Anfotericina B e do Fluconazol.

O EOCV demonstrou um efeito antiaderente alto no biofilme da cepa C16, inibindo 87,4% da biomassa do biofilme em uma concentração de 4x CIM, 85,5% da biomassa na

concentração de 2x CIM e 84,3% no valor da CIM. Anfotericina B apresentou redução significativa da adesão do biofilme de *C. albicans* em relação ao controle não tratado. No entanto, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos de 1xCIM, 2xCIM e 4xCIM, apresentando 80,5%, 84,2% e 84,3% entre esses tratamentos, respectivamente. O Fluconazol atuou de forma diferente, por conta da resistência apresentada pela cepa, houve uma menor redução da adesão em 4x CIM - 63,3%, 2x CIM - 50% e CIM - 45,2%.

Anfotericina B apresentou redução significativa da adesão do biofilme de *C. albicans* em relação ao controle não tratado. No entanto, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos de 1xCIM, 2xCIM e 4xCIM, apresentando 82,1%, 86,4% e 86,4% entre esses tratamentos, respectivamente. O Fluconazol atuou de forma semelhante, reduzindo a adesão em 4x CIM - 71%, 2x CIM - 71,8% e CIM - 68,5%.

Na erradicação do biofilme maduro é possível observar que tanto o óleo quanto os antifúngicos não apresentaram efeito contra o biofilme de ambas as cepas em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 3).

5.6. Enzimas hidrolíticas

Além do biofilme, a produção de enzimas hidrolíticas são um fator de virulência importante em espécies de *Candida*. Nesse sentido, avaliamos a diferença de produção de enzimas entre uma espécie sensível (ATCC 90028) e uma cepa resistente a Fluconazol (C16) e o efeito do óleo essencial de *C. verum* sobre a inibição de proteinase, fosfolipase e hemolisina (Figura 4). Para as proteinases, a cepa ATCC 90028 apresentou atividade moderada ($Pz=0,71\pm 0,12$), enquanto a cepa resistente a Fluconazol C16 não apresentou atividade proteásica. Quando avaliamos as fosfolipases, a cepa ATCC 90028 apresentou atividade de fosfolipase moderada ($Pz=0,71\pm 0,05$), enquanto a cepa LABMIC C16 apresentou atividade fosfolipásica potente ($Pz=0,60\pm 0,08$). Tanto o óleo, como os antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol foram capazes de inibir a atividade fosfolipásica para ambas as cepas.

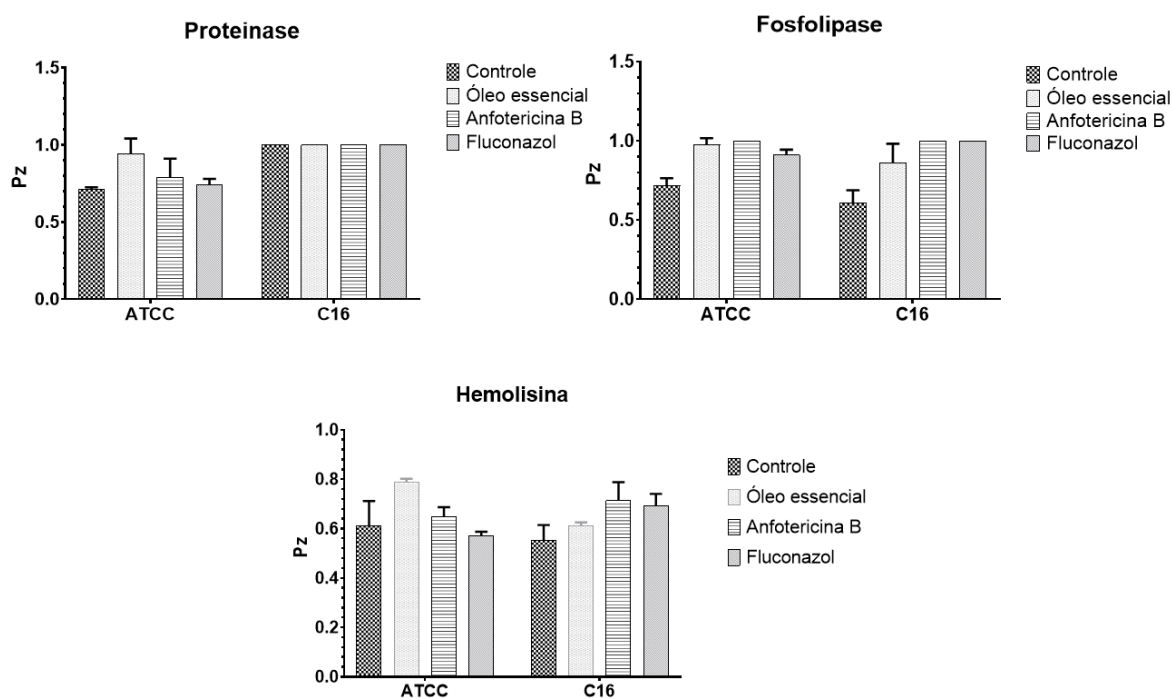


Figura 4. Efeito do óleo essencial de *C. verum* sobre enzimas hidrolíticas produzidas por *Candida albicans*. A atividade enzimática foi classificada em 5 grupos: ($Pz = 1$) sem atividade, ($0,90 > Pz \leq 0,99$) atividade fraca, ($0,80 > Pz \leq 0,89$) atividade suave, ($0,70 > Pz \leq 0,79$) atividade moderada, ($Pz \leq 0,69$) atividade potente

É interessante notar que a cepa resistente modulou de forma seletiva a produção de fatores de virulência, onde a cepa resistente ao Fluconazol manteve a atividade fosfolipásica, porém não apresentou atividade proteínica. As fosfolipases estão associadas à interação com lipídios de membrana e à penetração celular (Lopes *et al.*, 2022), processos intimamente relacionados às alterações estruturais que ocorrem em cepas resistentes aos azólicos. Em contrapartida, a expressão das proteinases secretadas (SAPs), envolvidas na degradação proteica do hospedeiro, pode ser reprimida como parte de um custo adaptativo, redirecionando recursos celulares para mecanismos de sobrevivência e manutenção da integridade da membrana.

Ambas as cepas apresentaram atividade hemolítica potente. A hemolisina atua na destruição de eritrócitos, facilitando a aquisição de ferro e a disseminação da infecção (Morgavero *et al.*, 2022). O tratamento com o óleo mostrou que essa atividade foi reduzida em ambas as cepas, com a cepa ATCC 90028 apresentando uma inibição da atividade maior ($0,61 \pm 0,02$) que os antifúngicos Anfotericina B ($Pz = 0,64 \pm 0,04$) e Fluconazol ($Pz = 0,55 \pm 0,02$). Em

contrapartida, a cepa C16 quando tratada com o óleo essencial de *C. verum* não apresentou alteração no seu poder hemolítico.

5.7. Mecanismo de ação por sorbitol e ergosterol

A investigação do mecanismo de ação do óleo essencial de *C. verum* se deu por meio dos ensaios com ergosterol e sorbitol, onde é possível avaliar os possíveis alvos celulares envolvidos em sua atividade antifúngica. O valor de CIM do óleo essencial de *C. verum* permaneceu inalterado na presença do ergosterol livre (Tabela 5). A alteração na CIM para Anfotericina B, confirma o mecanismo deste antifúngico de se ligar ao ergosterol da célula fúngica. Tal mecanismo resulta em perda da integridade celular e lise celular levando a célula fúngica a morte rápida, ação observada na curva de morte, que com 8 h de ação ocasionou morte de 100% de células fúngicas viáveis.

Tabela 5. Mecanismo de ação do óleo essencial de *C. verum* usando ergosterol 400 µg/mL e sorbitol a 0,8M.

Compostos	Ergosterol		Sorbitol	
	Antes	Depois	Antes	Depois
OE de <i>C. verum</i> (mg/mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Anfotericina B (µg/mL)	1,0	>128	-	-
Caspofungina (µg/mL)	-	-	0,125	>8

No ensaio com o protetor osmótico sorbitol também não ocorreu alteração da CIM, indicando que o mecanismo do óleo não é na parede celular fúngica. Desse modo, esses ensaios sugerem que o mecanismo antifúngico do composto esteja relacionado a mecanismos alternativos, como alteração da permeabilidade da membrana, podendo ser ocasionada pela inibição de precursores da composição da membrana fúngica, como ocorre nos azólicos ou ainda está relacionado à indução de estresse oxidativo e/ou modulação das bombas. Esses mecanismos afetam a homeostase e inibe a proliferação das células fúngicas. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na curva de morte, onde o óleo essencial apresentou um efeito fungistático, perfil compatível com a ausência de interação com ergosterol e β -glucanas, reforçando a hipótese de que o mecanismo de ação esteja associado à modulação de processos celulares essenciais à proliferação, e não a danos estruturais irreversíveis (Hou *et al.*, 2024; Leiva *et al.*, 2025).

5.8. Atividade Hemolítica

Para avaliar a toxicidade foi realizada a verificação do perfil de hemólise do óleo essencial das folhas de *C. verum*, dos antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol. Os dados

apresentados na figura 5 mostram em relação ao óleo uma LC_{50} de 7,56 mg/mL equivalente a (7.560 $\mu\text{g/mL}$), valor esse que chega a ser 3x maior que a concentração inibitória obtida. Já a Anfotericina B apresentou uma LC_{50} de 156 $\mu\text{g/mL}$ equivalente a 0,156 mg/ml, e o Fluconazol apresentou uma LC_{50} de aproximadamente 7,0 mg/mL.

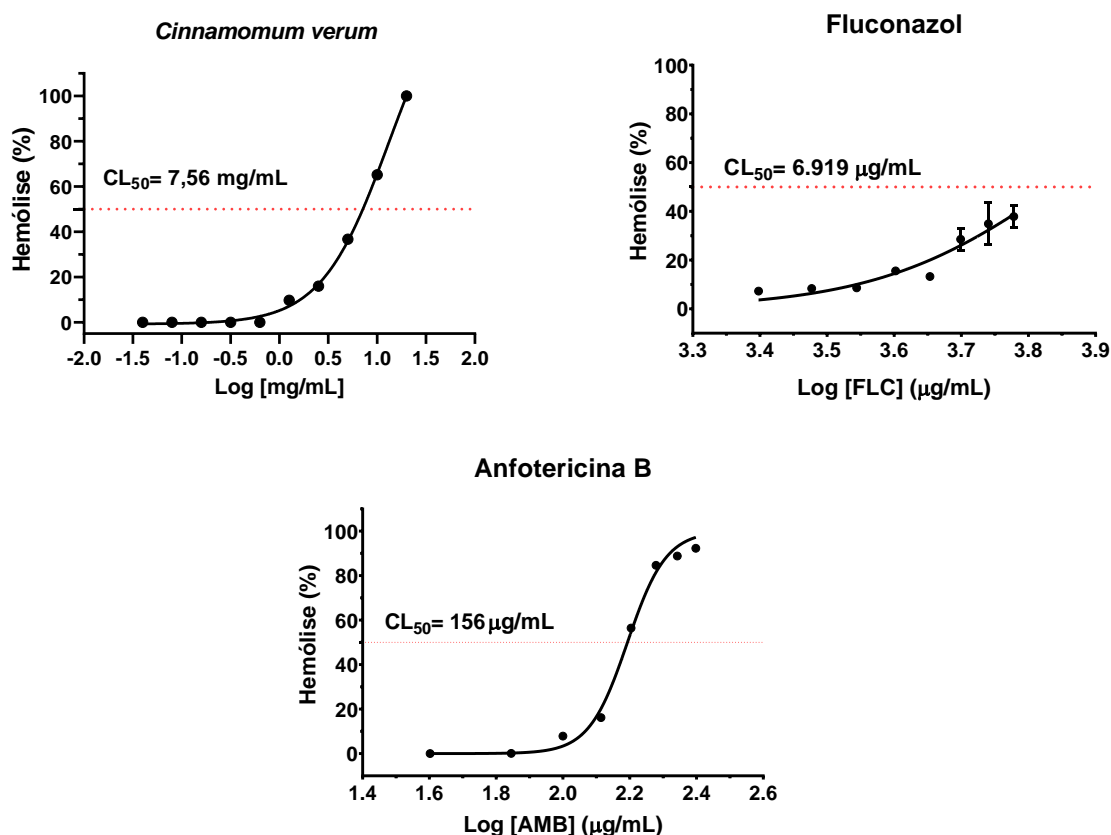


Figura 5. Atividade hemolítica do óleo essencial de *C. verum* e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol após 1 h de tratamento.

No estudo de Rangel e colaboradores 2018, avaliou-se a toxicidade por meio do método de hemólise, onde não apresentou toxicidade nas concentrações testadas. Perfil próximo à 50% da taxa de hemólise se apresentou em 2000 $\mu\text{g/mL}$, sendo essa concentração responsável por 40% da taxa de hemólise. Resultados de não toxicidade significativa também é apresentado por (Wijesinghe 2021), que avaliaram o perfil de citotoxicidade em células de queratinócitos humano (HacaT), apresentando ausência significativa de toxicidade, não apresentando inibição da viabilidade celular nas maiores concentrações testadas sendo utilizada até 1000 $\mu\text{g/mL}$. Resultado que corroboram com a toxicidade apresentada no presente estudo onde a concentração utilizada é até 7x para se obter uma LC_{50} .

6. CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo essencial extraído das folhas de *Cinnamomum verum* apresenta benzoato de benzila como composto majoritário, um quimiotipo foliar menos comum em relação aos perfis comumente descritos na literatura. Essa composição química influencia diretamente as propriedades biológicas do óleo, refletindo-se nas atividades antifúngicas observadas.

O óleo essencial demonstrou ação antifúngica significativa contra isolados de *Candida albicans*, incluindo cepas resistentes a Fluconazol, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 1,25 e 2,5 mg/mL. A cinética de morte indicou que o óleo possui efeito fungistático, mantendo as células na fase estacionária, em contraste com a ação rápida e fungicida da Anfotericina B. Os ensaios de combinação (*Checkerboard*) evidenciaram efeitos aditivos e sinérgicos quando o óleo foi associado a antifúngicos, sugerindo potencial para reduzir doses de fármacos e, possivelmente, contornar mecanismos de resistência, como o efluxo de drogas.

Além disso, o óleo essencial apresentou capacidade de inibição de biofilme, sendo mais eficiente na fase inicial de adesão das células, o que evidencia seu potencial de prevenir a formação de biofilmes e, conseqüentemente, reduzir a virulência e persistência das infecções. O tratamento com o óleo também modulou a atividade de enzimas hidrolíticas, incluindo fosfolipase, proteinase e hemolisina, reduzindo significativamente a virulência de isolados testados, especialmente a cepa sensível ATCC 90028.

Os estudos de mecanismo de ação sugerem que o efeito do óleo não está relacionado à ligação direta ao ergosterol da membrana, corroborando o caráter fungistático observado na curva de morte. A ausência de ação rápida típica de agentes que interagem com o ergosterol indica que outros mecanismos, possivelmente interferência em processos metabólicos ou na integridade da parede celular, podem ser responsáveis pela atividade antifúngica. Por fim, a avaliação da toxicidade evidenciou que o óleo essencial possui baixa hemólise.

Em conjunto, os achados deste estudo demonstram que o óleo essencial de *Cinnamomum verum*, especialmente do quimiotipo rico em benzoato de benzila, apresenta propriedades antifúngicas promissoras contra *Candida albicans*, com potencial para uso como agente terapêutico complementar ou preventivo, principalmente em estratégias voltadas à inibição de biofilme e redução da virulência fúngica. Estudos futuros poderão explorar mecanismos moleculares detalhados e avaliar a eficácia *in vivo*, consolidando o potencial farmacológico do óleo essencial desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ALENCAR, Bruna Maciel de. **Avaliação in vitro da ação microbica de *Lactobacillus spp.* sobre *Candida spp.*** 2021. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/10482/43344>. Acesso em: 08 dez. 2025.
- ALI, U.; Lu, S.; Fadlalla, T.; Iqbal, S.; Yue, H.; Yang, B.; Hong, Y.; Wang, X.; Guo, L. The functions of phospholipases and their hydrolysis products in plant growth, development and stress responses. **Progress in Lipid Research**, v. 86, p. 101158, 2022. doi:10.1016/j.plipres.2022.101158.
- ALMEIDA, Jhenyfer Caroliny; De Almeida, Priscilla Prates; GHERARDI, Sandra Regina Marcolino. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutr. Time**, v. 17, n. 01, p. 8623–8633, 2020.
- ALVES, L. S. *et al.* Teor, rendimento e composição química do óleo essencial de plantas de manjeriço submetidas ao estresse salino com NaCl. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 807–813, 2015.
- ANDRADE, M. A. *et al.* Essential oils of *Cinnamomum zeylanicum*, *Cymbopogon nardus* and *Zingiber officinale*: composition, antioxidant and antibacterial activities. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399–408, 2012.
- ANDRADE, Romário Maurício de *et al.* Sabedoria popular: o uso de remédios caseiros no tratamento dos sintomas da Covid-19 na Comunidade Indígena Tikuna Bom Jesus II, no município de São Paulo de Olivença, Amazonas/Brasil. 2022.
- ARAÚJO JM, de Almeida Junior JN, Magri MMC, Costa SF, Guimarães T. Epidemiological Assessment and Risk Factors for Mortality of Bloodstream Infections by *Candida* sp. and the Impact of the COVID-19 Pandemic Era. **J Fungi** (Basel). 2024;10(4):268. Published 2024 Apr 3. DOI:10.3390/jof10040268.
- ARANTES SM *et al.* (2019). Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal). *Food Chem Toxicol*, 133, 110747, doi:10.1016/j.fct.2019.110747.
- AREAL, Netya Aparecida Silva. **Atualização do manejo da candidíase vulvovaginal e candidíase vulvovaginal recorrente visando à melhora da assistência a mulheres e gestantes.** 2015. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) — Universidade Federal do Pará, Belém, 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpa.br/handle/2011/5030>. Acesso em: 12 dez. 2025.
- ASSAGGAF H M. Investigating the antidiabetic properties of *Apium graveolens* extract and its inhibition of enzymes associated with hyperglycemia. **Int J Biol Macromol.** 2025;290:138873. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.138873

- BABUSHOK, V. I.; Linstrom, P. J.; Zenkevich, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 40, n. 4, p. 043101, 2011. DOI: 10.1063/1.3653552.
- BARROS Gomes, Paulo Roberto *et al.* Avaliação da toxicidade e atividade moluscicida do óleo essencial *Cinnamomum zeylanicum* Blume contra o caramujo *Biomphalaria glabrata*. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, v. 48, n. 1, p. 112–127, 2019.
- BERLINCK, Roberto G. S.; GONÇALVES, E. C. B.; MENEZES, F. D.; TEIXEIRA, M. A. A química de produtos naturais do Brasil do século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.
- BEZERRA, André Parente de Brito *et al.* **Avaliação da atividade antifúngica de fitoconstituintes contra *Candida albicans***. 2015. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/54321>. Acesso em: 15 dez. 2025.
- BEZERRA, Felipe Gonçalves *et al.* Atividade antifúngica dos compostos de óleos essenciais frente às espécies de dermatófitos: uma revisão da literatura. **Revista Estudos – Revista de Ciências Ambientais e Saúde**, v. 51, p. 1–15, 2024.
- BEZERRA, Louise Morais Dornelas *et al.* Efeito da glicose sobre biofilmes de *Candida albicans* durante processo de invasão tecidual. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 1, p. 45–54, 2017.
- BORGES, Jessé Lahos *et al.* Estudo das atividades antimicrobianas de óleos essenciais e suas associações no controle da mastite em bovinos. **ARACÊ**, v. 6, n. 3, p. 10535–10553, 2024.
- BRAND-WILLIAMS, Wendy; CUVELIER, Marie-Elisabeth; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT – Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2011.
- BUTNARIU, Nica; Sarac, Ioan. Óleos essenciais de plantas. **Revista de Biotecnologia e Ciências Biomédicas**, v. 1, n. 4, p. 35-43, 2018. DOI: 10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489.
- CAMPOS, Tábata *et al.* Avaliação do comportamento de leveduras do gênero *Candida* a fármacos antifúngicos. **Ciência & Inovação**, v. 5, n. 1, p. 15–22, 2020.
- CANELA, H. M. S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, 2018.
- CASANOVA, Livia Marques; Costa, Sônia Soares. Interações sinérgicas em produtos naturais: potencial terapêutico e desafios. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 2, p. 575–595, 2017.
- CASTRO, C. C. *et al.* Chemical characterization of the essential oil from the leaves, branches and fruits of *Cinnamomum verum* J. Presl (Lauraceae). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 6, p. 41320–41333, 2020.

CASTRO, Ricardo Dias; Edeltrudes de Oliveira, L. I. M. A. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre cepas de *Candida*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 11, n. 3, p. 341–345, 2011.

CAVALCANTE, Carolina Sidrim P. *et al.* Atividade antifúngica de Ctn [15–34], o fragmento peptídico C-terminal da crotalicidina, uma catelicidina da glândula de veneno de cascavel. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 3, p. 231–237, 2017.

CHENG Y, Fu Y, Gu D, *et al.* Seasonal Variation in Chemical Composition and Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Cinnamomum cassia* Leaves. **Plants (Basel)**. 2024;14(1):81. Published 2024 Dec 30. doi:10.3390/plants14010081.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

COUTINHO, Eduardo João *et al.* Composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido das folhas da *Cinnamomum* sp. (Lauraceae) da região de Naviraí. **Anais do ENIC**, n. 10, p. 45–50, 2018.

CZAJKA, KM; Venkataraman, K.; Brabant-Kirwan, D.; Santi, SA; Verschoor, C.; Appanna, VD; Singh, R.; Saunders, DP; Tharmalingam, S. Mecanismos moleculares associados à resistência antifúngica em espécies patogênicas de *Candida*. **Cells** 2023, 12, 2655. <https://doi.org/10.3390/cells12222655>

SOUSA, D. P. *et al.* Essential Oils: Chemistry and Pharmacological Activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, artigo 1144, 2023. DOI: 10.3390/biom13071144.

DIAS, V. L. N. *et al.* Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas da *Cinnamomum zeylanicum* Breyn. 2009.

SANTOS, Janaina Gomes *et al.* Incidência de *C. albicans* e *C. parapsilosis* em hospitais e o mecanismo de resistência aos fármacos. **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n. 5, p. 40872–40886, 2022.

SANTOS, José Roberto Dantas de Andrade; Lima, Edeltrudes de Oliveira; Galvão, José Lucas Ferreira Marques; Oliveira Filho, Abrahão Alves de. Tratamento e manejo clínico das candidíases: uma breve revisão da literatura. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 651–657, 2024. DOI: 10.18378/rebes.v14i3.10540.

ESCALANTE, A.; Gattuso, M.; Pérez, P.; Zacchino, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Product**, v. 71, n. 10, p. 1710–1725, 2008.

FARIAS APP, Monteiro ODS, da Silva JKR, Figueiredo PLB, Rodrigues AAC, Monteiro IN, Maia JGS. Chemical composition and biological activities of two chemotype-oils from *Cinnamomum verum* J. Presl growing in North Brazil. **J Food Sci Technol**. 2020 Sep;57(9):3176-3183. doi: 10.1007/s13197-020-04288-7.

FERREIRA, Fabricio Leal *et al.* Tingimento de tecido de lã com corante natural extraído do fruto da *Cinnamomum verum* J. Presl. 2019.

FONTENELLE, R. O. S.; Morais, S. M.; Brito, E. H. S.; Kerntopf, M. R.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Tomé, A. R.; Queiroz, M. G. R.; Nascimento, N. R. F.; Sidrim, J. J. C. *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934–940, 2007.

FRANCO, Rosângela Damaris da Silva *et al.* Aditivos alimentares: flavorizantes e corantes como proposta de ensino de funções orgânicas. 2023.

FRONZA, Marcio *et al.* Óleos essenciais como alternativa de renda em áreas de sistemas silvipastoris. **Sistemas Integrados de Produção: Pesquisa e Desenvolvimento de Tecnologias**, p. 165–183, 2021.

GAFFAR, N. R.; Valand, N.; Venkatraman Girija, U. C. Candidiasis: Insights into virulence factors, complement evasion and antifungal drug resistance. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 272, 2025. DOI: 10.3390/13020272.

GIOLO, Muriel Padovani; Svidzinski, Terezinha Inez Estivalet. Fisiopatogenia, epidemiologia e diagnóstico laboratorial da candidemia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 46, p. 225–234, 2010.

HASHIZUME, Lina Naomi *et al.* Caracterização do potencial antifúngico de novos sais imidazólicos em *Candida albicans*: estudo in vitro. 2018.

HOU GW, Huang T. Essential oils as promising treatments for treating *Candida albicans* infections: research progress, mechanisms, and clinical applications. **Front Pharmacol**. 2024;15:1400105. Published 2024 May 15. DOI:10.3389/fphar.2024.1400105

HOUŠŤ J, Spížek J, Havlíček V. Antifungal Drugs. **Metabolites**. 2020;10(3):106. Published 2020 Mar 12. doi:10.3390/metabo10030106

JESUS, Sidnei Batista *et al.* Aromaterapia: os efeitos terapêuticos dos óleos essenciais especialmente na atenuação da ansiedade, estresse e depressão. **Revista Tópicos**, v. 2, n. 15, p. 1–16, 2024.

JOHNSON, Melissa D. *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693–715, 2004.

KEEREEDACH, P.; Hrimpeng, K.; Boonbumrung, K. Antifungal activity of Thai Cajuput oil and its effect on efflux-pump gene expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. **International Journal of Microbiology**, 2020;2020:5989206. Published 2020 Nov 4. doi:10.1155/2020/5989206.

KHOURI, S. *et al.* Avaliação de infecções por *Candida* em um hospital universitário da região do Vale do Paraíba, Estado de São Paulo, Brasil: distribuição de espécies, colonização,

fatores de risco e suscetibilidade antifúngica. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 7, n. 2, p. 51–57, 2016.

KIM NY, Kim S, Park HM, *et al.* *Cinnamomum verum* extract inhibits NOX2/ROS and PKC δ /JNK/AP-1/NF- κ B pathway-mediated inflammatory response in PMA-stimulated THP1 monocytes. **Phytomedicine**. 2023;112:154685. DOI:10.1016/j.phymed.2023.154685.

KWOLEK-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Res**. 2014;14(7):1068-1079. doi:10.1111/1567-1364.12202

KZAM, Pollyanna Melo *et al.* ***Cinnamomum verum* JS Presl (Lauraceae): padronização de processos extrativos e viabilidade de bioprodutos leishmanicidas**. 2022. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/67890>. Acesso em: 18 dez. 2025.

LEIVA-Mora M *et al.* Mecanismos antifúngicos de óleos essenciais de plantas: uma revisão abrangente da literatura para o desenvolvimento de biofungicidas. **Agricultura** . 2025; 15(21):2303. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture15212303>

LI, Yunxiao; HIND, Charlotte; FURNER-PARDOE, Jessica; *et al.* Understanding the mechanisms of resistance to azole antifungals in *Candida* species. **JAC Antimicrobial Resistance**, v. 7, n. 3, 2025. DOI: 10.1093/jacamr/dlaf106.

LIMA, Luanna de Oliveira. **Atividade antifúngica de di-hidrojasmona frente cepas de *Candida* spp. fluconazol resistentes**. 2021. Tese (Doutorado em Microbiologia) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/67890>. Acesso em: 20 dez. 2025.

LOPES JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**. 2022;13(1):89-121. doi:10.1080/21505594.2021.2019950

LOURENÇO, Luciano. Riscos naturais, antrópicos e mistos. **Territorium**, n. 14, p. 109–113, 2007.

LV QZ, Yan L, Jiang YY. The synthesis, regulation, and functions of sterols in *Candida albicans*: Well-known but still lots to learn. **Virulence**. 2016;7(6):649-659. doi:10.1080/21505594.2016.1188236

MALLICK, D. C.; Kaushik, N.; Goyal, L.; Mallick, L.; Singh, P. A Comprehensive Review of Candidemia and Invasive Candidiasis in Adults: Focus on the Emerging Multidrug-Resistant Fungus *Candida auris*. **Diseases**, v. 13, n. 4, p. 93, 2025. DOI: 10.3390/diseases13040093.

MAMDOUH, Daa; Smetanska, Iryna. Otimização de culturas de calos e suspensão de células de *Lycium schweinfurthii* para produção melhorada de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. **Horticulturae**, v. 8, n. 5, p. 394, 2022.

MCHUGH, Mary L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica** (Zagreb), v. 21, n. 3, p. 203–209, 2011. DOI: 10.11613/BM.2011.029.

MEHANI, T.; Sedky, A. F.; El-Sharkawy, E. A.; El-Banna, A. A. Methodology for Extraction of Essential Oils: A Review. **International Journal for Multidisciplinary Research (IJFMR)**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2023.

MENDES, Leandra Sofia dos Santos; Fontenele, Maria Alves. Atividade larvicida do óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum* Blume. 2019. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <http://www.repositorio.ufc.br/handle/riufc/12345>. Acesso em: 12 dez. 2025.

MOREIRA Silva, Alex Rennan *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cinnamomum cassia*. **Revista Foco (Interdisciplinary Studies Journal)**, v. 16, n. 11, p. 1–15, 2023.

MORGAVERO S, Höfs S, Lauer AN, Müller R, Brunke S, Allert S, Gerwien F, Groth S, Dolk E, Wilson D, *et al.* Candidalysin Is the Hemolytic Factor of *Candida albicans*. **Toxins**. 2022; 14(12):874. <https://doi.org/10.3390/toxins14120874>

MOTA, Aquiles Paulino Peres. Atividade antimicobacteriana do óleo essencial da casca de *Cinnamomum zeylanicum* e do trans-cinamaldeído e suas associações com rifampicina e isoniazida. 2017. Tese (Doutorado em Microbiologia) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2017. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/67891>. Acesso em: 25 dez. 2025.

NABAVI SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Efeitos antibacterianos da canela: da fazenda às indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. **Nutrientes** . 2015; 7(9):7729-7748. <https://doi.org/10.3390/nu7095359>

NARAYANANKUTTY A, Kunnath K, Alfarhan A, Rajagopal R, Ramesh V. Chemical Composition of *Cinnamomum verum* Leaf and Flower Essential Oils and Analysis of Their Antibacterial, Insecticidal, and Larvicidal Properties. **Molecules**. 2021;26(20):6303. 2021 Oct 19. doi:10.3390/molecules26206303

NASCIMENTO, Aleksandra; Prade, Ana Carla Koetz. **Aromaterapia: o poder das plantas e dos óleos essenciais**. Recife: Fiocruz-PE, 2020.

NATH, A.; Saha, P.; Roy, S.; *et al.* Essential oils as natural bioactive compounds: chemical composition, biological activities and applications. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 2024.

NOUÉR, Simone Aranha *et al.* Mudança na epidemiologia de candidemia: dados de um hospital de alta complexidade. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 28, p. 104433, 2024.

OKAMURA, Luana Sayuri *et al.* Avaliação do potencial antifúngico do extrato da própolis verde contra leveduras do gênero *Candida* spp. 2019. Tese (Doutorado em Microbiologia) — Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019. Disponível em: <https://www.teses.usp.br/handle/123456789/67892>. Acesso em: 10 dez. 2025.

OLIVEIRA Ferreira, Genize; Nunes Lemes, Laís Flávia. Análise farmacognóstica e de rotulagem da canela (*Cinnamomum cassia* (L.) J. Presl) e do açafrão (*Curcuma longa* L.), comercializados como condimentos, em Valparaíso-GO. **Revista de Medicina e Saúde de Brasília**, v. 7, 2018, p. 45–56.

OLIVEIRA, Rose Kelli Batista; Sarmiento, Ana Margareth Marques Fonseca. O uso dos óleos essenciais de gerânio e junípero no rejuvenescimento facial. **Diálogos em Saúde**, v. 2, n. 1, p. 20–30, 2019.

OLIVEIRA, Thaís Lima *et al.* Utilização de plantas medicinais por idosos em três bairros do Município de Conceição do Almeida-BA. **BIOFARM – Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v. 14, n. 2, p. 138–151, 2018.

OLIVEIRA, V. M. C. *et al.* *Lactobacillus* is able to alter the virulence and the sensitivity profile of *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1737–1744, 2016.

PAGLIARI, S.; Forcella, M.; Lonati, E.; Sacco, G.; Romaniello, F.; Rovellini, P.; Fusi, P.; Palestini, P.; Campone, L.; Labra, M.; Bulbarelli, A.; Bruni, I. Antioxidant and anti-inflammatory effect of cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) bark extract after in vitro digestion simulation. **Foods**, v. 12, n. 3, p. 452, 2023.

PANDUR E *et al.* (2022). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oils Prepared at Different Plant Phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Activated THP-1 Macrophages. *Antioxidants* (Basel), 11, 2022. doi:10.3390/antiox11071330.

PORRELLO, Antonella; Vaglica, Alessandro; SAVOCA, Dario; BRUNO, Maurizio; SOTTILE, Francesco. Variability in *Crithmum maritimum* L. essential oils' chemical composition: PCA analysis, food safety, and sustainability. **Sustainability**, v. 16, n. 6, p. 2541, 2024. DOI: 10.3390/su16062541.

PAZ, Cléo Bona *et al.* Resistência de espécies de *Candida* não *albicans* aos antifúngicos azólicos: uma revisão narrativa. 2021. Tese (Doutorado em Microbiologia) — Universidade de Brasília, Brasília, 2021. Disponível em: <https://repositorio.unb.br/handle/123456789/67893>. Acesso em: 3 dez. 2025.

PRICE, M. F.; Wilkinson, I. D.; Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

RAJ *et al.* Detection of adulteration in commercial samples of *Cinnamomum verum* JS Presl from Kerala. **European Journal of Biomedicine**, v. 5, p. 297–304, 2018.

RANASINGHE, Priyanga *et al.* Propriedades medicinais da canela 'verdadeira' (*Cinnamomum zeylanicum*): uma revisão sistemática. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1–10, 2013.

RANGEL ML, de Aquino SG, de Lima JM, Castellano LR, de Castro RD. *In Vitro* Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume Essential Oil on *Candida* spp. Involved in Oral Infections. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2018;2018:4045013. Published 2018 Oct 17. DOI:10.1155/2018/4045013

REIS, Juliana Borges *et al.* Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 342–363, 2020.

REZENDE, Jessika Lima *et al.* Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais das cascas de duas variedades de *Citrus sinensis* e das flores de *Psidium guajava*. 2020. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/123456789/67895>. Acesso em: 5 dez. 2025.

SALAZAR S. B. *et al.* An Overview on Conventional and Non-Conventional Therapeutic Approaches for the Treatment of Candidiasis and Underlying Resistance Mechanisms in Clinical Strains. **J Fungi** (Basel). 2020;6(1):23. Published 2020 Feb 10. doi:10.3390/jof6010023.

SCHWANKE, Carla Helena Augustin *et al.* Especiarias e ervas aromáticas: um elo entre sabor, aroma, cor e saúde. **Editora da PUCRS**, 2024.

SHARMA, K., Parmanu, PK & Sharma, M. Mecanismos de resistência antifúngica e desenvolvimentos em estratégias alternativas para combater a infecção por *Candida albicans*. **Arch Microbiol** 206, 95 (2024). <https://doi.org/10.1007/s00203-023-03824-1>.

SILVA Junior, Anísio Antônio da. **Desenvolvimento de um gel dermatológico para gatos formulado com moléculas antimicrobianas naturais para tratamento de doenças fúngicas**. 2020. Tese (Doutorado em Farmacologia) — Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufmg.br/handle/123456789/67896>. Acesso em: 8 dez. 2025.

SILVA Santos, Crislene; Bispo, Irailde Neves; de Souza, Otaciana Almeida. Candidíase vulvovaginal recorrente: o papel do enfermeiro. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 3, p. 470–483, 2021.

SILVA, Camilly Duarte de Melo; Bragatto, Heloísa Duran; Oliveira, Jéssica Tainara Sabbadin de. Utilização de óleos essenciais para repelir o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*. 2019. Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/67897>. Acesso em: 15 dez. 2025.

SILVA, Dirlei Badotti da *et al.* Coleção de propostas utilizando produtos naturais para a introdução ao tema ácido-base (parte II): extração e armazenamento. **Educación Química**, v. 29, n. 2, p. 3–16, 2018.

SILVA, Luana Nascimento *et al.* Indústria de óleos essenciais no Brasil: uma perspectiva a partir do programa de modernização das estatísticas econômicas. In: **Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências (CONAPESC)**, 2019.

SILVA, Matheus Merson de Araújo *et al.* Avaliação da atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra cepas de *Candida* spp. 2019. Tese (Doutorado em Microbiologia) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/67898>. Acesso em: 12 dez. 2025.

SOARES, Dagmar Mercado *et al.* Candidíase vulvovaginal: uma revisão de literatura com abordagem para *Candida albicans*. **Brazilian Journal of Surgery & Clinical Research**, v. 25, n. 1, p. 1–10, 2018.

SOARES, Izadora Viana *et al.* Antibiotecoterapia: alterações na microbiota intestinal e suas consequências. **Caderno de Graduação – Ciências Biológicas e da Saúde – UNIT-SERGIPE**, v. 8, n. 1, p. 35–47, 2023.

SOUZA, Diorryayne Lima *et al.* Plantas medicinais como alternativa no controle de diabetes mellitus tipo 2. 2022. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) — Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2022. Disponível em: <https://repositorio.ufc.br/handle/riufc/67899>. Acesso em: 28 dez. 2025.

SPENCE, Charles. Nutmeg and mace: The sweet and savoury spices. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 36, p. 100936, 2024. DOI: 10.1016/j.ijgfs.2024.100936.

TAFF, H. T.; Nett, J. E.; Andes, D. R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 214–218, 2012.

WIJESINGHE GK, de Oliveira TR, Maia FC, *et al.* Efficacy of true cinnamon (*Cinnamomum verum*) leaf essential oil as a therapeutic alternative for *Candida* biofilm infections. **Iran J Basic Med Sci.** 2021;24(6):787-795. DOI:10.22038/ijbms.2021.53981.12138.

WIJESINGHE GK, Maia FC, de Oliveira TR, *et al.* Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the in-vivo toxicity with *Galleria mellonella* model. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2020;115:e200349. Published 2020 Sep 25. DOI:10.1590/0074-02760200349.

ANEXO I- Artigo de revisão a ser submetido ao *Archives of Current Research International*

Antifungal activity of *Cinnamomum verum* J.Presl against *Candida* species: a review

Pedro Henrique Lima Rodrigues¹; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar²; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle²

¹ Master's in Health Sciences, Medical School, Federal University of Ceará, Brazil;

² Department of Agricultural and Biological Sciences, State University Vale of Acaraú, Brazil.

Abstract

The number of cases of invasive fungal infections has increased in recent years and intensified due to increased resistance to conventional antifungals. Among the pathogens, those of the genus *Candida* stand out, opportunistic yeasts and the main cause of systemic fungal infections. Optional therapeutic alternatives for controlling these species are natural products. One of the species that can be used is *Cinnamomum verum* and its products. This study aimed to review the antifungal activity of *Cinnamomum verum* against species of the genus *Candida*. This is a narrative review, of a descriptive nature, carried out using articles published in databases relevant to the topic. The research revealed that the essential oil of *Cinnamomum verum* has significant antifungal activity, with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) values between 0.062 and 1 mg/mL, against several *Candida* species. Furthermore, considerable antibiofilm activity was observed, with a reduction in biomass and cell viability. When combined with standard antifungals, such as fluconazole and amphotericin B, and oil-to-oil, the oil showed a modulatory effect, exhibiting synergistic ($FIC < 0.5$) and additive ($0.5 < FIC \leq 1.0$) interactions. The effects are mainly linked to the destabilization of fungal membrane integrity, increased cell permeability, and leakage of intracellular contents. It showed low toxicity in both evaluation methods. These activities emphasize the importance of using *Cinnamomum verum* and its compounds in the search for new antimicrobial therapies.

Key-words: Anti-candidal; antibiofilm; biological activity; fungal membrane; synergistic.

1. Introduction

The use of medicinal plants in the treatment of diseases, including infections caused by microorganisms, is an ancient practice adopted worldwide, having been supported by science through the isolation of compounds with antimicrobial activity from botanical extracts (Essid *et al.*, 2023). Essential oils, which originate from the secondary metabolites of plants, have great potential as bioactive compounds and have been used in the prevention and treatment of various diseases (Wijesinghe *et al.*, 2020; Barbarossa *et al.*, 2024).

One of these plant species that possesses diverse biological properties is *Cinnamomum verum* J.Presl (synonym *Cinnamomum zeylanicum* Blume), popularly known as true cinnamon or cinnamon (Rangel *et al.*, 2016). Belonging to the Lauraceae family, it is an aromatic plant which, in addition to exhibiting antimicrobial activity, also has properties as an insecticide, antioxidant, and is also used as a food flavoring (Castro *et al.*, 2020; Farias *et al.*, 2020).

In addition, *C. verum* J.Presl has been widely used in folk medicine due to its antiparasitic and anti-inflammatory properties. It is also indicated for cardiovascular benefits due to its action in reducing blood glucose levels, serum cholesterol, and blood pressure (Shang *et al.*, 2021; Zhang *et al.*, 2024). The use of the plant's bark is recommended as an appetite stimulant, to combat dyspepsia, as an antifatulent, and as an antispasmodic (Pagliari *et al.*, 2023).

Several research projects are currently underway to identify the therapeutic properties of bioactive compounds against fungal species, with particular emphasis on studies focused on evaluating the activity of extracts and essential oils of *C. verum* against yeasts of the genus *Candida* (Al-Mijalli *et al.*, 2023; Essid *et al.*, 2023). In particular, *C. verum* has shown significant antifungal activity, with bioactive compounds such as cinnamaldehyde and other essential constituents demonstrating efficacy *in vitro* (Essid *et al.*, 2023; Rangel *et al.*, 2018).

Among the fungi that cause infection, yeasts of the genus *Candida* stand out, which are responsible for about 80% of fungal infections in the hospital environment (Tamo, 2020), and constitute a relevant cause of bloodstream infections. The overall mortality rate of fungemias caused by *Candida* spp. is 40 to 60% (Hirano *et al.*, 2015). Among the species of the genus *Candida*, *C. albicans* is the most frequently isolated in patients with invasive fungal infections (Khouri *et al.*, 2016).

Given the increasing incidence of infections caused by *Candida* species and the rise in resistance to conventional antifungals, this narrative review aims to gather, analyze, and discuss

the available scientific evidence on the antifungal activity of *C. verum* against different *Candida* species, addressing efficacy and bioactive compounds.

2. Methodology

The literature review was conducted based on the principles of a descriptive narrative study, based on a bibliographic analysis of scientific articles. The aim was to synthesize the available knowledge on the anti-*Candida* activity of the species *C. verum*. Searches were conducted between April 2025 and December 2025 in the PubMed, Lilacs, and Science Direct databases, using the descriptor *C. verum* combined with keywords such as ‘anti-*Candida*’, ‘antifungal activity’, and ‘biological activity’. Articles published in Portuguese or English were included based on their relevance to the topic, following the evaluation of titles, abstracts, and, when necessary, full-text analysis.

3. Results and discussion

3.1. Natural products of plant origin

Natural products of plant origin occupy a prominent position in the history of medicine, having been used for millennia by various civilizations as a therapeutic resource to treat infections, pain, inflammation, and other physiological imbalances. With the advancement of science, many of these traditional knowledges have begun to be investigated from a more systematic perspective, allowing not only the validation of their properties, but also the identification of the compounds responsible for their pharmacological actions (Khosravi *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2017).

In particular, in recent decades, there has been a growing interest in bioactive substances extracted from plants, originating from secondary metabolites, which function in plants as self-defense against attacks, especially due to the increase in microbial resistance to conventional medicines and the search for safer and less aggressive alternatives to the human body (Qureshi *et al.*, 2025; Khosravi *et al.*, 2018; Nasir *et al.*, 2015).

Within this context, essential oils and extracts, in particular, have attracted significant attention. Obtained through processes such as distillation, cold pressing, or solvent extraction, these volatile extracts are composed of complex mixtures of chemical substances, including monoterpenes, sesquiterpenes, phenols, aldehydes, and esters (Khosravi *et al.*, 2018; Brochot *et al.*, 2017).

These molecules act synergistically, thereby conferring a broad spectrum of biological activities to the oils, including antibacterial, antifungal, antiviral, anti-inflammatory, and antioxidant properties. What makes essential oils particularly interesting is their ability to

inhibit the growth of pathogenic microorganisms, including resistant strains, with mechanisms of action distinct from commonly used synthetic drugs (Ansari *et al.*, 2020; Brochot *et al.*, 2017; Han and Parker, 2017). Several aromatic plants have been studied for their antifungal potential, with particular emphasis on species such as *Origanum vulgare* (oregano), *Thymus vulgaris* (thyme), *Cinnamomum zeylanicum* (cinnamon), *Melaleuca alternifolia* (tea tree), and *Syzygium aromaticum* (clove) (Veilleux *et al.*, 2019; Brochot *et al.*, 2017; Qiao *et al.*, 2021).

The essential oils of these plants have demonstrated, in different *in vitro* studies, the ability to inhibit the growth of *Candida* spp., disrupt the fungal cell membrane, and inhibit the formation of biofilms. These effects, associated with low toxicity and the fact that they do not promote resistance as quickly as synthetic antifungals, make plant products strong candidates for the formulation of new drugs or topical products with antimicrobial action (Qureshi *et al.*, 2025; Lee *et al.*, 2020; Veilleux *et al.*, 2019).

Plant biodiversity offers a still largely unexplored potential of bioactive molecules, many of which may represent viable solutions to contemporary public health challenges. However, although the laboratory results are encouraging, more robust clinical studies are still needed to confirm the efficacy and safety of these compounds in humans, as well as to standardize concentrations, forms of application, and extraction methods (Lee *et al.*, 2020; Khosravi *et al.*, 2018; Han and Parker, 2017).

3.2. *Cinnamomum verum*: botanical aspects and phytochemical profile

Cinnamomum verum, also known as Ceylon cinnamon or true cinnamon, is a plant belonging to the Lauraceae family, widely recognized for both its culinary and medicinal value. Originating in South Asia, particularly Sri Lanka, southern India, and parts of Burma, this species is currently cultivated in several tropical regions, where the warm and humid climate favors its growth (Husain *et al.*, 2018; Farias; Monteiro *et al.*, 2020). It is a medium-sized evergreen tree with oval, leathery, bright green leaves. The inner bark of the trunk and young branches is the most valued part (Almubayedh H *et al.*, 2018).

Throughout history, *C. verum* has been used in traditional medicine in various parts of the world, particularly as a digestive aid, antiseptic, natural food preservative, and therapeutic agent for respiratory and gastrointestinal disorders. Additionally, this species has been reported to exhibit antidiabetic, anti-inflammatory, and anticancer effects. These traditional applications have encouraged more in-depth scientific investigations into its chemical constituents and bioactive potential (Kim NY *et al.*, 2023; Farias; Monteiro *et al.*, 2020).

Among the major chemical compounds present in *C. verum*, cinnamaldehyde stands out, accounting for approximately 60% to 70% of the essential oil composition and serving as its main constituent (Essid *et al.*, 2023). Furthermore, cinnamaldehyde may also predominate in the essential oil extracted from the leaves (Almeida *et al.*, 2017), although the most common leaf chemotype is eugenol-rich (Lin *et al.*, 2024). In addition to cinnamaldehyde and eugenol, some leaf essential oils have benzyl benzoate as the major compound (Farias *et al.*, 2020), accounting for up to 95.3% of the total composition of the extracted oil.

Cinnamaldehyde, in particular, is responsible not only for the characteristic aroma of cinnamon but also for many biological properties. Eugenol, present in greater quantity in the leaves, exhibits analgesic, antimicrobial, and anti-inflammatory activity. Benzyl benzoate, in turn, is considered rare in some chemotypes but has been pharmaceutically proven to act in the treatment of scabies (Monteiro *et al.*, 2017; Ansari *et al.*, 2020).

Several studies have indicated that the constituents of *C. verum* exhibit a wide range of pharmacological properties, including antioxidant activity, preventing cell damage, antimicrobial activity, with proven efficacy against a variety of bacteria and fungi, including species of the genus *Candida*; in addition to anti-inflammatory effects, modulating the production of cytokines and inhibiting pro-inflammatory enzymes, and modulation of glycemic and lipid dysregulation. These characteristics make this plant a promising natural source of bioactive agents with potential application in therapeutic formulations and phytotherapeutic products (Silva, *et al.*, 2022; Lee *et al.*, 2020; Teles *et al.*, 2019; Han and Parker, 2017).

3.3. Antifungal activity of *C. verum* oil against *Candida* species

The genus *Candida* belongs to the kingdom Fungi and is classified within the phylum Ascomycota. It is included in the class Saccharomycetes and is part of the family Saccharomycetaceae (Silva *et al.*, 2019). The genus comprises several species of yeasts that, although frequently present in the human microbiota of healthy individuals, about 39% are yeast carriers, with 89% being colonized by *C. albicans*, which can become pathogenic when the microbial balance is altered or under conditions of immunosuppression (Lin *et al.*, 2024; Essid *et al.*, 2023).

These yeasts have the potential to cause a variety of infections, ranging from superficial and localized forms, such as oral and vaginal candidiasis, to severe systemic infections, including candidemia and septicemia (Lin *et al.*, 2024; Varadarajan *et al.*, 2015). These infections represent a significant threat to public health, particularly in high-risk clinical settings, such as among hospitalized or immunosuppressed patients. In these individuals, the

immune system's ability to contain fungal dissemination is compromised, promoting disease progression and increasing the risk of severe outcomes, including death (Soares *et al.*, 2023).

Among the most relevant *Candida* species currently are *C. albicans*, *C. glabrata*, and *C. parapsilosis*. While *C. albicans* is the most prevalent in clinical isolates, in recent decades, there has been an increase in cases of candidemia caused by non-*albicans Candida*, mainly *C. glabrata* and *C. parapsilosis*, and factors such as high tolerance to fluconazole exposure and intrinsic resistance, respectively, are aggravating factors in cases involving these species (Pinho *et al.*, 2024; Pappas *et al.*, 2018).

Epidemiologically, *C. albicans* remains the most prevalent species in various clinical settings. Oropharyngeal candidiasis, for example, is a common manifestation in immunosuppressed individuals, such as HIV/AIDS patients, those undergoing chemotherapy, or those on prolonged antibiotic use. It is also a clinical picture conducive to candidemia, a fatal condition with mortality rates exceeding 70% in critical clinical cases (Lin *et al.*, 2024; Sahal *et al.*, 2020; Veilleux *et al.*, 2019).

The fact that *C. albicans* is the most prevalent isolate in fungal infections justifies the large number of studies dedicated to this species, since its clinical predominance makes it the main target of epidemiological, therapeutic, and pharmacological investigations. In light of this, all studies found with *C. verum* extracts evaluated their efficacy against this species (Table 1).

Table 1. Chemical composition of different parts of *C. verum* and antifungal activity against *Candida* species

P a r t s	Extract/Extraction method	Major compounds	<i>Candida</i> spp.	MIC (mg/mL)	Reference
B a r k	Essential oil/ Hydrodistillation	Cinnamaldehyde – (82,09%); 1,8- cineole (3,1%); α -copaene (3,06%)	<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,125	Essid R, Ayed A, Djebali K, <i>et al.</i> 2023.
	Hydroalcoholic extract	Not informed	<i>C. albicans</i>	0,01562	Varadarajan, Saranya <i>et al.</i> 2015.

	Aqueous extract	Cinnamaldehyde (71,35%); Eugenol (6,18%); Linalool (6,02%); β -caryophyllene (6,02%)	<i>C. albicans</i>	0,5 – 1	Veilleux <i>et al.</i> 2019.
	Essential oil/Steam distillation	Cinnamaldehyde – (74%); α -caryophyllene (5,3%); Linalool- (3,9%); <i>E</i> -cinnamyl acetate (3,8%)	<i>C. albicans</i>	0,125 – 1	Shahina, Zinnat <i>et al.</i> 2018.
	Essential oil/ Stem distillation	Cinnamaldehyde- (66,1 %); β -caryophyllene- (5,6%); <i>E</i> -cinnamyl acetate (5,5%).	<i>C. auris</i>	0,6	Di Vito M, Garzoli S, Rosato R, <i>et al.</i> 2023
	Essential oil/Commercially obtained	Not informed	<i>C. albicans</i> ATCC1023;R01	0,156 - 0,313	Sisopa <i>et al.</i> , 2025
	Essential oil/Commercially obtained	<i>Trans</i> -cinnamaldehyde- 66,43%	<i>C. albicans e C. auris</i>	0,3 - 1,3	Tran, Hoang N H <i>et al.</i> 2020
	Essential oil	-	<i>C. albicans</i>	0,0312 - 0,125	Carvalho <i>et al.</i> , 2018
L e a v e s	Essential oil/Commercially obtained	Eugenol - 62,57%	<i>C. albicans e C. auris</i>	0,3 - 1,3	Tran, Hoang N H <i>et al.</i> 2020
	Essential oil/Stem distillation	Eugenol (73%); β -caryophyllene (4,8%), Linalool (2,5%)	<i>C. albicans</i> -sensitive and resistant to fluconazole	0,5 – 1	Shahina, Zinnat <i>et al.</i> 2022.
	Essential oil/ Commercially obtained	Eugenol (80%).	<i>C. albicans</i>	0,25 - 0,5	Lin, Yi-Ting <i>et al.</i> 2024.
	Essential oil/ Hydrodistillation	Cinnamaldehyde (50%); <i>E</i> -cinnamyl acetate e 1,8 cineole	<i>C. glabrata</i> ATCC 2001	1	Almeida <i>et al.</i> 2017.

Essential oil/ Hydrodistillation	Eugenol (77,22%); benzyl benzoate (4,53%); <i>Trans</i> - caryophyllene (3,39%)	<i>C. albicans</i> ATCC MYA - 2876; <i>C. dubliniensis</i> ATCC MYA - 646; <i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1	Wijesinghe, Gayan Kanchana <i>et al.</i> 2021.
Essential oil/ Hydrodistillation	Cinnamaldehyde (82,09%); 1,8- cineole (3,1%); α - copaene (3,06%)	<i>C. albicans</i> 311; <i>C. ciferrii</i> 648; <i>C. tropicalis</i>	0,031 - 0,062	Essid R <i>et al.</i> 2017.
Essential oil/ Hydrodistillation	Eugenol (68,96%)	<i>C. albicans</i> ATCC 60193; <i>C. krusei</i> ATCC 60193; <i>C.</i> <i>tropicalis</i> ATCC 750	0,125 – 1	Rangel <i>et al.</i> , 2018.
Essential oil/ Hydrodistillation	Eugenol (77,22%) Benzyl benzoate- (4,53%); <i>Trans</i> - Caryophyllene- (3,39%)	<i>C. albicans</i> ATCC MYA - 2876; <i>C. dubliniensis</i> ATCC MYA - 646; <i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1	Wijesinghe, Gayan Kanchana <i>et al.</i> , 2020

3.4. Antibiofilm activity of *C. verum* oil against *Candida* spp.

Candida has a unique ability to form biofilms (Wijeshinghe *et al.*, 2021). A biofilm is a cluster of fungal cells surrounded by an extracellular matrix that adheres to biotic and abiotic surfaces, such as mucous membranes and medical devices. Biofilm formation is a key factor in *Candida* resistance to antifungal treatments, making it more difficult to eradicate by the immune system and conventional therapies. The ability to form biofilms is more pronounced in some species, such as *Candida albicans* and *Candida glabrata*, and is one of the main reasons why these infections can persist even after the administration of antifungals (Wijeshinghe *et al.*, 2021).

Biofilm formation not only significantly hinders treatment but also favors the occurrence of persistent and recurrent infections. Structurally, biofilms provide physical protection against antifungal agents and act as an effective barrier against immune cells, representing a considerable clinical challenge (Di Fiore *et al.*, 2025; Gharbi *et al.*, 2019).

Several studies have proven the antibiofilm activity of *C. verum* essential oil against *Candida* species, both in inhibiting adhesion, preventing biofilm formation, and in eradicating mature biofilm. The cinnamaldehyde-rich bark oil was able to inhibit biofilm adhesion by 86% at a concentration of 0.0049% (Veilleux *et al.*, 2019). In the presence of mature biofilm, the oil also showed activity, reducing viable cells treated for 60 min with the oil by 48%, however, no reduction in total biomass was observed. This suggests a non-destructive mechanism of the matrix, as the three-dimensional structure was maintained and the dead cells still remain attached.

Another study corroborates this antibiofilm activity by showing that the oil was able to eradicate 100% of the viability of mature biofilm at a concentration of 4 mg/mL with treatment for 24h (Wijeshinghe 2021). In addition, cell wall damage and intracellular leakage were observed by SEM. This suggests a dose-dependent effect, since at a higher concentration and for a longer treatment time the oil was able to eradicate 100% of the mature biofilm, compared to lower concentrations.

Sisopa *et al.*, 2025, evaluated the inhibitory and eradicated action of various essential oils, taking into account concentrations responsible for inhibiting and eradicating 90% of biofilms. The essential oil of *C. verum* showed a CMIB (Minimum Concentration of Biofilm Inhibition - 90%) of 0.156 mg/mL, and a CMEB (Minimum Concentration of Biofilm Eradication - 90%) of 0.313 mg/mL. Regarding the study by Wijeshinghe *et al.* 2020, it is observed that the treatment period is shorter in the process of verifying anti-adhesion activity. The cells were exposed to treatment for a period of 2 hours at concentrations ranging from 2 - 0.0039 mg/mL, and showed a 50% reduction in the metabolic percentage at concentrations between 1-2 mg/mL.

Rangel *et al.*, 2018, in their study, examined the action of *C. verum* oil on single-species and multi-species biofilms, showing a 50% reduction in the adhesion factor of both types of biofilms and in pre-formed (24h) single-species *C. albicans* and *C. tropicalis* biofilms at a concentration of 0.5 mg/mL. This percentage is only achieved in multi-species biofilms at concentrations >0.5 mg/mL - 1 mg/mL, a significant effect observed after 24 hours of treatment for the multi-species biofilm. However, reduced activity was observed in the adhesion phase. El-Bah *et al.*, 2021, observed that the oil, at sub-inhibitory concentrations ($\frac{1}{4}$ MIC), reduced the adhesion process by 60-75%, depending on the isolate, indicating strong anti-adhesion activity even at sub-MIC concentrations.

3.5. Modulatory effect of *C. verum* against *Candida* spp.

The evaluation of the modulatory effect of *C. verum* essential oil is carried out using techniques such as Checkerboard and modified microdilution focusing on the ICIF (Fractional Inhibitory Concentration Index), which, being = or < 0.5, indicates a synergistic effect; > 0.5 =/< 1, indicates an additive effect; > 1 =/< 4, indicates an indifferent effect; > 4 indicates an antagonistic effect, which may be a compound/drug or compound/compound interaction. As presented by (Shahina *et al.*, 2022), the potential interaction between cinnamon and clove essential oils showed an associative effect, modifying the antifungal profile of both isolated compounds. The reduction against the ATCC 10231 strain is characterized as a consistent synergistic effect, presenting an ICIF = 0.5 ± 0.0 , while in relation to the RSY150 strain, it presented an ICIF = 0.72 ± 0.16 , being considered an additive effect.

Another study corroborates this synergistic activity by showing that the oil interacted with two standard drugs, amphotericin B and fluconazole, exhibiting a synergistic effect for both (Essid *et al.*, 2017), presenting an ICIF = 0.5 for interaction with amphotericin B and 0.37 for fluconazole. This value is close to that observed in the study by (Di Vito *et al.*, 2023), where cinnamon essential oil showed a potentiation of its activity through a strongly synergistic interaction with fluconazole, presenting an ICIF = 0.26 ± 0.14 .

3.6. Mechanism of action of *C. verum* in *Candida* species

The essential oil of *C. verum*, particularly that derived from the bark, exhibits a marked pleiotropic effect, meaning that its active compounds (mainly trans-cinnamaldehyde and eugenol) act on multiple targets in the fungal cell (Figure 1). The main target is damage to the membrane of *Candida* cells (Train *et al.*, 2020) and inhibition of cell wall biosynthesis (Rangel *et al.*, 2018; Castro *et al.*, 2013). Additionally, inhibition of morphogenesis has been reported as one of the mechanisms for both oil extracted from the bark and oil extracted from the leaves (Train *et al.*, 2020). Both oils also showed a reduction in hemolysin production, which causes an anti-virulence effect, since inhibition of these enzymes affects iron uptake from erythrocytes.

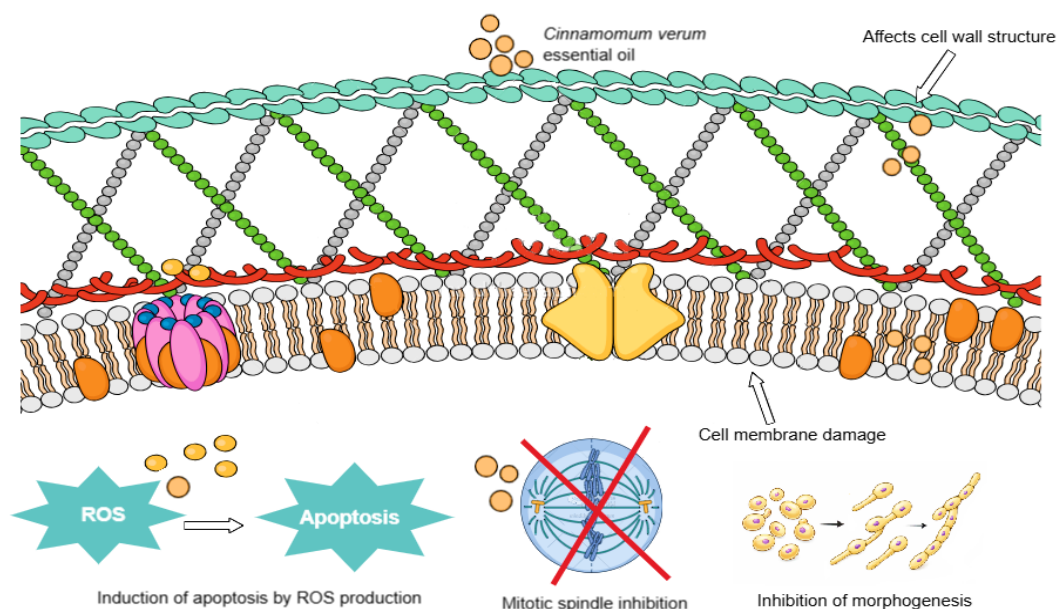


Figure 1. Multi-target mechanisms of action of *C. verum* against *Candida* species

Source: Prepared by the authors.

Another secondary target of the oil is the mitotic spindle and the cell cycle. The oil alters the distribution of β -tubulin, which causes cell cycle arrest, plasma membrane disruption, and leakage of intracellular contents, an effect attributed to cinnamaldehyde, which alone caused complete inhibition of mitotic spindle assembly (Shahina *et al.*, 2018).

Cytotoxicity

The cytotoxicity assessment of *C. verum* has been described using in vivo and in vitro assays with various cell lines. Cytotoxicity on B11 and GSM-K cell lines of human oral epithelial cells (keratinocytes/human gingival epithelium) showed that the oil is safe up to 0.0625% in B11 cells. However, GSM-K cells were more sensitive, showing a 73.8% reduction at this concentration (Veilleux *et al.*, 2019). A study using *Galleria mellonella* showed that the oil did not affect the larvae at any concentrations tested (up to 1,000 $\mu\text{g/mL}$) (Wijesinghe *et al.*, 2020). In human erythrocytes, no significant reduction ($p > 0.05$) in cell viability was observed up to 1,000 $\mu\text{g/mL}$, indicating no relevant cytotoxicity toward red blood cells at effective antifungal concentrations. (Rangel *et al.*, 2018). In assays with HaCaT cells (human keratinocytes), *C. verum* oil rich in eugenol showed no effect at any of the concentrations evaluated (up to 1000 mg/mL) (Wijesinghe *et al.*, 2020).

The literature reports a comparison between the toxicity of free and encapsulated oil. In a study with the murine macrophage cell line RAW 264.7 (mammalian cells), the free oil showed four times greater toxicity compared to the oil nanoencapsulated in chitosan

nanoparticles (Essid *et al.*, 2023). Although the IC₅₀ value of the free oil was not reported for comparison with other studies, it is important to emphasize that encapsulation may be employed as a strategy to mitigate potential adverse effects. Another study that reinforces this hypothesis showed that nanoemulsion of the oil at concentrations below 400 µg/mL did not present detectable cytotoxicity in splenocytes, *in vitro*, and *in vivo* (400 µg/mL, 20 µL/day/mouse for 5 days, intravaginally) no relevant clinical signs of systemic or local toxicity were observed, with the *Lactobacillus* microbiota remaining preserved (Lin *et al.*, 2024).

Conclusion

It has been reported that *Cinnamomum verum* essential oil exhibits significant antifungal activity against various *Candida* species, primarily *Candida albicans*, and also shows activity against non-*albicans* species such as *C. glabrata*, *C. tropicalis*, and *C. krusei*, species currently highly prevalent in more severe cases and demonstrating antifungal resistance.

It also exhibits antibiofilm activity, preventing adhesion and eradicating pre-established biofilms. The oil's modulatory effect showed synergism against fluconazole and an additive effect against amphotericin B. The main mechanism involves damage to the integrity of the fungal plasma membrane, leading to increased permeability and leakage of intracellular contents. The observed activity and the safety demonstrated by the oil in *in vitro* and *in vivo* cytotoxicity assays demonstrate the oil's safety for use in fungal infections.

Although the results obtained are promising, it is important to consider that the chemical composition of essential oils can vary significantly between different collection periods, due to environmental, seasonal, and physiological factors of the plant, which can influence the observed biological profile. However, the major components can serve as models for new antifungals, particularly in the treatment of infections caused by resistant strains.

Statements

Author contributions

PHLR: Writing – original draft, Investigation, Writing – review & editing, Methodology, Data curation. FLLA: Supervision, Validation, Writing – review & editing, Visualization. MC: Writing – review & editing, Resources. ROSF: Visualization, Resources, Validation, Funding acquisition, Supervision, Writing – review & editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research and/or publication of this article. The authors are grateful for federal and state resources agencies for financial support. P.H.L.R is the recipient of a master's scholarship from the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Ministry of Education and Culture (MEC), Federal Government of Brazil. R.O.S.F. and F.L.L.A is thankful to the State Funding Agency (FUNCAP).

Conflict of interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Almeida LFD, *et al.* Atividade inibitória de óleos essenciais vegetais frente à *Candida glabrata* resistente a fluconazol. *Rev Bras Cienc Saude.* 2017;133-138.
- Almubayedh H, Ahmad R, Naqvi AA, Ahmad N. Ethnopharmacological uses and public knowledge regarding *Cinnamomum zeylanicum* in Khobar, Saudi Arabia. *J Pharm Bioallied Sci.* 2018;10(3):159-165. doi:10.4103/jpbs.JPBS_71_18.
- Ansari MA, *et al.* *Cinnamomum verum* bark extract mediated green synthesis of ZnO nanoparticles and their antibacterial potentiality. *Biomolecules.* 2020;10(2):336. doi:10.3390/biom10020336.
- Barbarossa A, *et al.* Exploring the antibiofilm effect of sertraline in synergy with *Cinnamomum verum* essential oil to counteract *Candida* species. *Pharmaceuticals (Basel).* 2024;17(9):1109. doi:10.3390/ph17091109.
- Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen.* 2017;6(4):e00459. doi:10.1002/mbo3.459.
- Carvalho PCL, *et al.* Inibição de fatores de virulência de cepas clínicas de *Candida albicans* pelo óleo essencial de *Cinnamomum zeylanicum*. *Microbiologia PSM.* 2018;1:4-12.
- Di Fiore A, *et al.* β -carbonic anhydrases of *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans*. *The Enzymes.* 2025:100014. doi:10.1016/j.enz.2025.100014.
- Di Vito M, Garzoli S, Rosato R, *et al.* A new potential resource in the fight against *Candida auris*: the *Cinnamomum zeylanicum* essential oil in synergy with antifungal drug. *Microbiol Spectr.* 2023. doi:10.1128/spectrum.04385-22.

El Baz AM, *et al.* Back to nature: combating *Candida albicans* biofilm, phospholipase and hemolysin using plant essential oils. *Antibiotics (Basel)*. 2021;10(1):81. doi:10.3390/antibiotics10010081.

Essid R, *et al.* Anti-*Candida* and anti-leishmanial activities of encapsulated *Cinnamomum verum* essential oil in chitosan nanoparticles. *Molecules*. 2023;28(15):5681. doi:10.3390/molecules28155681.

Essid R, Hammami M, Gharbi D, *et al.* Antifungal mechanism of *Cinnamomum verum* and *Pelargonium graveolens* essential oils combined with fluconazole against pathogenic *Candida*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2017;101:6993-7006. doi:10.1007/s00253-017-8442-y.

Farias APP, Monteiro ODS, da Silva JKR, *et al.* Chemical composition and biological activities of two chemotype oils from *Cinnamomum verum* growing in North Brazil. *J Food Sci Technol*. 2020;57(9):3176-3183. doi:10.1007/s13197-020-04288-7.

Han X, Parker TL. Antiinflammatory activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil in a human skin disease model. *Phytother Res*. 2017;31(7):1034-1038. doi:10.1002/ptr.5822.

Hirano R, Sakamoto Y, Kudo K, Ohnishi M. Retrospective analysis of mortality and *Candida* isolates of 75 patients with candidemia: a single hospital experience. *Infect Drug Resist*. 2015;8:199-205. doi:10.2147/IDR.S80677.

Husain I, *et al.* Phytochemical characterization and biological activity evaluation of ethanolic extract of *Cinnamomum zeylanicum*. *J Ethnopharmacol*. 2018;219:110-116. doi:10.1016/j.jep.2018.02.001.

Khouri S, *et al.* Avaliação de infecções por *Candida* em hospital universitário: distribuição de espécies e suscetibilidade antifúngica. *Rev Pan-Amaz Saude*. 2016;7(2):51-57. doi:10.5123/S2176-62232016000200006.

Khosravi AR, *et al.* Chemical composition, antioxidant activity and antifungal effects of five Iranian essential oils against *Candida* strains isolated from urine samples. *J Mycol Med*. 2018;28(2):355-360. doi:10.1016/j.mycmed.2018.01.005.

Kim NY, Kim S, Park HM, *et al.* *Cinnamomum verum* extract inhibits NOX2/ROS and PKC δ /JNK/AP-1/NF- κ B pathway-mediated inflammatory response in PMA-stimulated THP-1 monocytes. *Phytomedicine*. 2023;112:154685. doi:10.1016/j.phymed.2023.154685.

Lee JE, Seo SM, Huh MJ, Lee SC, Park IK. Reactive oxygen species mediated-antifungal activity of cinnamon bark (*Cinnamomum verum*) and lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oils and their constituents against two phytopathogenic fungi. *Pestic Biochem Physiol*. 2020;168:104644. doi:10.1016/j.pestbp.2020.104644

Lin YT, *et al.* Enhancing therapeutic efficacy of cinnamon essential oil by nanoemulsification for intravaginal treatment of *Candida* vaginitis. *Int J Nanomedicine*. 2024;19:4941-4956. doi:10.2147/IJN.S458593.

Liu Q, *et al.* Antibacterial and antifungal activities of spices. *Int J Mol Sci.* 2017;18(6):1283. doi:10.3390/ijms18061283.

Monteiro IN, *et al.* Chemical composition and acaricide activity of an essential oil from a rare chemotype of *Cinnamomum verum* on *Rhipicephalus microplus*. *Vet Parasitol.* 2017;238:54-57. doi:10.1016/j.vetpar.2017.03.016.

Pagliari S, *et al.* Antioxidant and anti-inflammatory effect of *Cinnamomum verum* bark extract after in vitro digestion simulation. *Foods.* 2023;12(3):452. doi:10.3390/foods12030452.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers.* 2018;4:18026. Published 2018 May 11. doi:10.1038/nrdp.2018.26.

Pinho S, Miranda IM, Costa-de-Oliveira S. Global epidemiology of invasive infections by uncommon *Candida* species: a systematic review. *J Fungi.* 2024;10(8):558. doi:10.3390/jof10080558.

Rangel ML, Aquino SG, Lima JM, Castellano LR, Castro RD. In vitro effect of *Cinnamomum zeylanicum* essential oil on *Candida* spp. involved in oral infections. *J Pathog.* 2018;2018:4045013. doi:10.1155/2018/4045013.

Sahal G, *et al.* Antifungal and antibiofilm effect of *Cymbopogon citratus* essential oil on biofilm formation by *Candida tropicalis*: an in vitro study. *J Ethnopharmacol.* 2020;246:112188. doi:10.1016/j.jep.2019.112188.

Shahina Z, *et al.* Cinnamon leaf and clove essential oils are potent inhibitors of *Candida albicans* virulence traits. *Microorganisms.* 2022;10(10):1989. doi:10.3390/microorganisms10101989.

Shahina Z, *et al.* *Cinnamomum zeylanicum* bark essential oil induces cell wall remodeling and mitotic spindle defects in *Candida albicans*. *Fungal Biol Biotechnol.* 2018;5:3. doi:10.1186/s40694-018-0046-5.

Shang C, *et al.* Beneficial effects of cinnamon and its extracts in the management of cardiovascular diseases and diabetes. *Food Funct.* 2021;12(24):12194-12220. doi:10.1039/D1FO01935J.

Silva MMA, *et al.* Atividade antifúngica do extrato etanólico de própolis vermelha contra isolados patogênicos de *Candida* spp. *Rev Verde Agroecol Desenvolv Sustent.* 2020;15(4):429-433. doi:10.18378/rvads.v15i4.7969.

Sisopa P, *et al.* Multitarget anti-*Candida* activity of Thai plant extracts and essential oils. *Scientifica (Cairo).* 2025;2025:1766872. doi:10.1155/sci5/1766872.

Tamo SPB. *Candida* infections: clinical features, diagnosis and treatment. *Infect Dis Clin Microbiol.* 2020;2(2):91-102. doi:10.36519/idcm.2020.0006.

Teles AM, *et al.* *Cinnamomum zeylanicum*, *Origanum vulgare*, and *Curcuma longa* essential oils: chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2019;2019:2421695. doi:10.1155/2019/2421695.

Tran HNH, *et al.* In vitro antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(20):8911-8924. doi:10.1007/s00253-020-10829-z.

Varadarajan S, *et al.* In vitro anti-mycotic activity of hydro alcoholic extracts against fluconazole-resistant *Candida albicans*. *J Clin Diagn Res.* 2015;9(8):ZC07-ZC10. doi:10.7860/JCDR/2015/14178.6273.

Veilleux MP, Grenier D. Determination of the effects of cinnamon bark fractions on *Candida albicans* and oral epithelial cells. *BMC Complement Altern Med.* 2019;19:303. doi:10.1186/s12906-019-2730-2.

Wijesinghe GK, *et al.* Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and in vivo toxicity using *Galleria mellonella*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2020;115:e200349. doi:10.1590/0074-02760200349.

Wijesinghe GK, de Oliveira TR, Maia FC, *et al.* Efficacy of *Cinnamomum verum* leaf essential oil as a therapeutic alternative for *Candida* biofilm infections. *Iran J Basic Med Sci.* 2021;24(6):787-795. doi:10.22038/ijbms.2021.53981.12138.

Zhang K, *et al.* Effect of cinnamon supplementation on blood pressure, oxidative stress, and inflammatory biomarkers in adults: umbrella review. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2024;34(12):2659-2668. doi:10.1016/j.numecd.2024.08.009.

ANEXO II- Artigo experimental a ser submetido *Planta Medica* (Fator de impacto 2.1)

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cinnamomum verum* J.Presl CONTRA ISOLADOS CLÍNICOS DE *Candida albicans* SENSÍVEIS E RESISTENTES A FLUCONAZOL

Pedro Henrique Lima Rodrigues¹; Francisca Lidiane Linhares de Aguiar²; Maria Alyce Albuquerque Fernandes¹; Jean Parcelli Costa do Valle³; Maria Rosário Martins^{4,5}; Silvia Macedo Arantes⁵; Elnatan Bezerra de Souza²; Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle^{1,2}.

1 Universidade Federal do Ceará, Av. Cmte. Maurocélvio Rocha Pontes, 100, Jocely Dantas de Andrade Torres, 62042-250 Sobral, CE, Brazil

2 Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Av.

Padre Francisco Sadoc de Araujo, 850, Alto da Brasília, 62010-295 Sobral, CE, Brazil 3

Universidade Estadual Vale do Acaraú, Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Av. Padre Francisco Sadoc de Araujo, 850, Alto da Brasília, 62010-295 Sobral, CE, Brazil 4

Departamento de Ciências Médicas e da Saúde, Universidade de Evora, Colégio Luís António Verney, Rua Romão Ramalho, 59, 7000-671 Évora, Portugal

5 HERCULES Laboratory, Instituto de Investigação e Formação Avançada (IIFA), Universidade de Evora, Palácio do Vimioso, Largo Marquês de Marialva 8, 7000-809, Evora, Portugal

1. INTRODUÇÃO

Candida é um fungo comum e frequentemente encontrado nos ambientes hospitalares, sendo principal microrganismo causador de infecções emergente e infecções invasivas, se tornando mais prevalentes em pacientes neonatos prematuros, com procedimentos cirúrgicos, imunocomprometidos ou em situação de estado grave nas unidades de tratamento intensivo, sendo responsável por altas taxas de morbimortalidade (Araújo *et al.*, 2024; Silva 2024; Santos *et al.*, 2024).

Cerca de 46,3% dos casos de candidíase invasivas são causadas por *Candida albicans*, enquanto 53,7% corresponde à outras espécies de *Candida*. Essas infecções vem se tornado cada vez mais difíceis de tratar por conta de diversos fatores, sendo o biofilme um dos principais, além disso o desenvolvimento de diversos mecanismo de resistência às diferentes classes de antifúngicos utilizados no meio clínico, como azólicos, políenos e equinocandinas, apresentando mutações em diversos genes, sendo EGR 11 principal pela codificação da lanosterol, bombas de efluxo como ABC e MFS, e alterações na composição dos constituintes da membrana pelo ergosterol (Mallick *et al.*, 2025; Gaffar *et al.*, 2025; Li Y, 2025).

Recentemente, o interesse em produtos de origem vegetal, especialmente OEs, aumentou devido às suas potentes propriedades antimicrobianas (Abers *et al.*, 2021). São produtos naturais, líquidos e voláteis, originários dos conhecidos metabólitos secundários das plantas, que tem como principal característica atuar na defesa e interação com o ambiente. No geral os óleos essenciais apresentam dois ou três compostos principais, podendo estar presente em concentrações de 20% a 90% (Porrello *et al.*, 2025; Nath *et al.*, 2024). Da caneleira, bem como de diversas outras plantas, é possível obter óleos, frequentemente denominados óleos etéreos. Por seu aroma marcante, são referidos como essências (Butnariu, 2018). Amplamente utilizada na medicina popular, na forma de chá e infusão e também diversas práticas culinárias por ser uma especiaria que agrega muito sabor e aroma a diversos pratos (Charles Spence, 2024).

Uma das principais propriedades atribuídas a *Cinnamomum verum* é a capacidade de inibir o estresse oxidativo, por possuir ação antioxidante (Pagliari, 2023). Além disso, estudos apresentam que o óleo essencial possui uma ação antifúngica significativa contra espécies do gênero *Candida*, incluindo *C. albicans*. dificultando a formação de biofilmes e diminuindo a viabilidade das células fúngicas associadas a essas estruturas, o que é importante, já que esses fatores contribuem diretamente para o surgimento e a persistência das infecções. Entre outras atividades biológicas estão antidiabética, anti-inflamatória, anticolinérgica e antimicrobiana (Mamdouh, 2022; Assaggaf, 2025; Kim NY *et al.*, 2023; Wijesinghe *et al.*, 2021; Wijesinghe *et al.*, 2020; Pagliari, 2023).

Atualmente, são imprescindíveis pesquisas que confirmem a eficácia do potencial antimicrobiano de produtos naturais e que investiguem o arsenal químico proveniente do metabolismo secundário das plantas na busca de compostos que possam ser utilizados no combate a infecções fúngicas causadas por microrganismos resistentes. Portanto, esse estudo se propõe caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial de *C. verum*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Material vegetal

As folhas da canela verdadeira foram coletadas no IV setor do Perímetro Irrigado Araras Norte, Coordenadas: 4° 09' de latitude Sul e 40° 32' de longitude Oeste – *C. verum* J. Presl e a exsicata foi depositada no Herbário Prof. Francisco José de Abreu Matos (HUVA) da Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA), onde foi taxonomicamente identificada com auxílio de literatura especializada e por comparação com materiais previamente incorporados ao acervo do HUVA. A exsicata está depositada com número de registro 26473.

2.2. Extração e composição química do óleo essencial

A extração do OE foi feita de acordo com Mehani (2023) com modificações, utilizando a hidrodestilação por 2h, em um aparelho dosador tipo Clevenger, onde o processo de obtenção do óleo se dá pela penetração de partículas de água no material vegetal efetuando o arraste de partículas de óleo, que se separam ao chegar no condensador e assim o óleo se depõe na parte graduada do Clevenger. Foram avaliadas as propriedades físicas como rendimento, densidade, cor e aparência. O rendimento do óleo foi calculado em função do volume final em mL dividido pela massa seca em gramas e multiplicado pelo fator de conversão em porcentagem. Para determinar a densidade, a massa do óleo em gramas foi dividida pelo volume do óleo em mL.

A análise química dos óleos essenciais (OE) foi realizada de acordo com Arantes *et al.* (2019), por cromatografia gasosa. As análises por CG-FID foram realizadas com um cromatógrafo gasoso Shimadzu Nexis GC 2030 com detector de ionização de chama (CG-FID) equipado com um injetor automático AOC-20i plus (Laboratório HERCULES, Univ. Évora, Portugal), com dimensões de 30 m x 0,25 mm d.i. e espessura do filme de 0,50 µm, e uma coluna capilar de sílica fundida não polar Zebron ZB 5HT Inferno™ (Phenomenex, EUA), utilizando o software LabSolutions versão 5.92 (Shimadzu Corporation). As análises de GC-MS foram realizadas com um cromatógrafo gasoso GC-MS-QP2010 Series (Shimadzu), equipado com sílica fundida não polar Zebron ZB-5HT Inferno™ (30 m × 0,25 mm d.i., espessura do filme 0,50 µm), acoplado a um detector modelo Polaris Q (quadrupolo E.I.). Os compostos foram identificados por seus índices de retenção (IR) e seus espectros de massa da biblioteca NIST11 (Instituto Nacional de Padrões e Tecnologia). Os índices de retenção foram determinados por interpolação em relação aos tempos de retenção de n-alcenos C8–C22 e comparados com os de amostras autênticas, do banco de dados do laboratório e com dados da literatura (Babushok *et al.*, 2011; Arantes *et al.*, 2019; Pandur *et al.*, 2022).

2.3. Microrganismos

As cepas utilizadas nesse estudo foram 6 isolados clínicos de *Candida albicans* do Laboratório de Microbiologia – LABMIC (LABMIC 0102, LABMIC 0104, LABMIC 0105, LABMIC 0133, LABMIC C16 e LABMIC C14), provenientes da Santa Casa de Misericórdia de Sobral, da Micoteca da UNILAB e da cepa padrão ATCC 90028 da *American Type Culture Collection*. As cepas foram previamente identificadas por Vitek, Chromoagar e biologia molecular.

2.4. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação do CIM do óleo essencial foi realizada pelo método de microdiluição, utilizando placas de microdiluição contendo 96 poços em fundo U de acordo com CLSI, norma M27-A3 (CLSI, 2008). O meio de cultura usado foi o *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI-1640), contendo glutamina, indicador de fenol em coloração avermelhada e ausência de bicarbonato. Os compostos foram diluídos a 10 mg/mL. O óleo foi diluído em RPMI e 5% de DMSO. Inicialmente foram adicionados 100 µl do RPMI em todos os poços, seguido de 100 µl dos compostos adicionados à primeira coluna. A partir disso foram realizadas diluições seriadas até a concentração de 0,0097 mg/ml. A Anfotericina B (Sigma) foi utilizada como controle no intervalo de concentração de 16–0,0078 µg/ml. O Fluconazol (Medley) foi testado no intervalo de concentração de 64–0,032 µg/ml. Por fim, foi feita a suspensão do inóculo preparada de acordo a escala McFarland 0.5 (10^6 UFC/mL), seguido de uma diluição em RPMI de 1:2000 (2×10^2 UFC/mL). 100 µL do inóculo foram adicionados em todos os poços. Foram adicionados controles de crescimento do inóculo, controle de esterilidade do meio e um controle de turbidez dos compostos (composto sem inóculo). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Após a determinação da CIM do óleo essencial foi determinada a Concentração Fungicida Mínima de ambos os compostos.

2.5. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Na determinação da Concentração Fungicida Mínima foram retiradas alíquotas de 100 µL dos poços que não tiveram crescimento fúngico visível na microdiluição foram semeados em placas de meio de cultivo sabouraud dextrose agar (SDA). As placas foram incubadas a 37 °C por 24h. Após isso, a menor concentração que não apresentou crescimento de colônias foi a concentração fungicida mínima (Fontenelle *et al.*, 2007).

2.6 Curva de morte

O efeito fungicida do(s) agente(s) testado(s) sobre *Candida albicans* foi avaliado por meio do ensaio de curva de morte (time-kill). As cepas *C. albicans* utilizadas foram previamente mantidas em ágar Sabouraud a 36 °C por 24 h. A partir de colônias jovens, preparou-se uma suspensão em solução salina estéril, ajustada de acordo com a escala de MacFarland para aproximadamente $1-5 \times 10^6$ células/mL e posteriormente diluída em RPMI 1640 tamponado (pH 7,0). As soluções dos agentes antifúngicos foram preparadas em solvente apropriado e diluídas no meio de cultura para alcançar concentração correspondente a CIM. Na placa de 96 poços com os compostos nas concentrações desejadas, adicionou-se o inóculo e considerou-se

o tempo zero imediatamente após a inoculação. As culturas foram incubadas a 36 °C, e alíquotas de 100 µL foram coletadas nos tempos 0, 4, 8, 12, 24h. As diluições adequadas foram semeadas por espalhamento em ágar Sabouraud em duplicata e incubadas por 24 h a 36 °C. O número de células viáveis foi expresso em log (CFU/mL). (Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza, 2014). Os dados foram analisados estatisticamente por meio de média e desvio-padrão, com comparação entre tempos e tratamentos utilizando ANOVA seguida de teste post-hoc apropriado ($\alpha = 0,05$) (McHugh, Mary L. 2011).

2.7. Checkerboard

O efeito do composto combinado com antifúngico padrão foi determinado pela técnica do *Checkerboard*, método usado para determinar a interação dos fármacos através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracional (ICIF). O ICIF foi calculado pela adição da Concentração Inibitória Fracional (CIF) para cada um dos compostos ensaiados, sendo definida como a adição dos valores de CIM de cada fármaco na combinação e CIM do mesmo fármaco sozinho (Johnson *et al.*, 2004). Sendo utilizadas uma cepa padrão e um isolado clínico resistente para analisar e comparar o efeito combinatório.

A turbidez das suspensões fúngicas foi preparada e ajustada para 0,5 na escala McFarland (10^6 UFC/mL). Nas soluções utilizaram-se os produtos testados, nas concentrações dos seus respectivos valores de CIM, adicionou-se 50 µL do meio RPMI 1640 a todos os 96 poços da placa de microdiluição. Adicionaram-se, na primeira coluna 50 µL do óleo essencial, e em seguida, foram realizadas diluições em série na placa até a 10ª coluna, com a concentração do óleo essencial variando entre CIM e CIM/10. Nas linhas, na vertical, dispuseram-se de 50 µL dos antifúngicos padrões (Anfotericina B), em diferentes concentrações variando entre CIM e CIM/8. Por fim, 100 µL de inóculo são adicionados a todos os poços. Foi utilizado como controle negativo o meio RPMI 1640 com o inóculo. Como controle positivo foi utilizado as CIM do antifúngico padrão e do óleo essencial separadamente. Os ensaios realizaram-se em duplicata. O efeito foi definido como sinérgico quando o índice ICIF for $<$ ou $= 0,5$, efeito aditivo com $ICIF > 0,5$ e $<$ ou $= 1,0$, indiferente com $ICIF > 1,0$ e $<$ ou $= 4,0$ e antagonismo com $ICIF > 4,0$ (Johnson *et al.*, 2004).

2.8. Quantificação total da biomassa do biofilme

Utilizada a técnica de cristal violeta para quantificar a biomassa total de biofilme, onde foi disposto em placa de poliestireno de fundo chato uma alíquota de 100 µl de suspensão fúngica. Depois foram adicionados 100 µl dos tratamentos de cada composto nas concentrações

de CIM, 2xCIM e 4xCIM, também foram adicionados controles de crescimento, em seguida a placa foi incubada a 37°C por 48 h. Para o biofilme maduro, foram adicionados 200 µl do inóculo a placa de poliestireno e incubada por 48 h. Após o período de incubação, a placa foi lavada três vezes com 200 µl de solução salina e foram adicionados os tratamentos de cada composto nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM. A placa foi incubada a 37°C por 24 h. Após os períodos de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 200 µl de solução salina para remover células planctônicas. Para fixação do biofilme, foram adicionados 200 µl de metanol (99%) por um período de 10 min. Com as placas já secas em temperatura ambiente, foi adicionado 200 µl de cristal violeta a 1% (M/V) por um período de 10 min. E em seguida, as placas foram lavadas 3x com água destilada estéril. Para dissolver o corante presente nas células aderidas foram utilizados 200 µl de ácido acético a 33% (V/V) por 10 min. O conteúdo foi transferido para uma nova placa e a leitura foi realizada em espectrômetro a 590 nm. E a porcentagem de inibição de formação do biofilme para cada concentração foi calculada de acordo com a fórmula: % de inibição do biofilme = $100 - (\text{OD da amostra tratada} / \text{OD do controle positivo não tratado}) \times 100$ (Taff *et al.*, 2012).

2.9. Ensaio de enzimas hidrolíticas

Os ensaios foram realizados em concentrações subinibitórias (1/4 CIM) do óleo essencial de *C. verum* e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol sobre a secreção de proteinases, fosfolipases, e hemolisinas das cepas de *C. albicans*. Foram utilizadas uma cepa de referência sensível (ATCC 90028) a fluconazol e um isolado clínico resistente a fluconazol (C16). As suspensões foram ajustadas a 0,15 no espectrofotômetro a 520 nm em PBS. As células foram incubadas por 30 min a 37°C após os tratamentos. Após o período de incubação, os tubos foram centrifugados a 3.000 g por 10 min, em seguida o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em PBS. As células foram inoculadas em SDA suplementado com diferentes substratos para detectar cada tipo de enzima. Para as proteinases, o meio SDA foi suplementado com 1 g de albumina de soro bovino (BSA, Biosera, Nuaille, Pays de la Loire—França). Para fosfolipase, o SDA foi preparado com 29,22 g NaCl + 0,28 g de CaCl₂, e suplementado com emulsão de gema de ovo (1:10 v/v). A atividade de hemolisina foi determinada utilizando SDA (Sabouraud Dextrose agar- Himedia) suplementado com 3% de glicose (p/v) e 7% de sangue de carneiro (v/v). As placas suplementadas foram incubadas a 37°C por 5 dias para proteinase, 3 dias para fosfolipase e 48 h para hemolisina. A atividade enzimática (Pz) foi determinada pela razão entre o diâmetro da colônia da levedura e o diâmetro total da zona de precipitação (colônia + zona de precipitação). A atividade enzimática foi

classificada em 5 grupos: ($P_z = 1$) sem atividade, ($0,90 > P_z \leq 0,99$) atividade fraca, ($0,80 > P_z \leq 0,89$) atividade suave, ($0,70 > P_z \leq 0,79$) atividade moderada, ($P_z \leq 0,69$) atividade potente (Price, Wilkinson, Gentry 1982; Oliveira *et al.*, 2016; Canela *et al.*, 2018).

2.10. Ensaio de mecanismo de ação por sorbitol e ergosterol

Os ensaios de sorbitol e ergosterol são métodos utilizados para determinar o mecanismo de ação de novos agentes antifúngicos contra *Candida* spp. O sorbitol atua como um protetor osmótico da parede celular, onde um aumento na Concentração Inibitória Mínima (CIM) sugere interferência na síntese de β -1,3-glucana. Enquanto que, o ergosterol exógeno reverte a inibição se o agente se liga a ele nas membranas. Para o ambos os ensaios, as CIMs (Concentrações Inibitórias Mínimas) foram determinadas para a cepa ATCC 90028 na ausência e presença de ergosterol (400 μ g/mL) e sorbitol (0,8M). Foi utilizado o controle Caspofungina para o ensaio do sorbitol e Anfotericina B para o ensaio do ergosterol. Um valor de CIM inalterado (comparado ao grupo controle) na presença de sorbitol demonstra que o composto não tem como alvo a parede, e, portanto, a presença do sorbitol é irrelevante. Por outro lado, um aumento na CIM na presença de sorbitol indica que o óleo essencial tem como alvo a parede celular.

Já o aumento da CIM na presença do ergosterol, indica que o composto se liga ao ergosterol exógeno, enquanto valores inalterados de CIMs indicam que o mecanismo não está relacionado à ligação ao ergosterol. Os valores de CIM foram determinados utilizando o método de microdiluição em triplicata, descrito anteriormente. Concomitantemente, foram preparados controles de esterilidade do meio de cultura (RPMI) e de viabilidade da cepa (RPMI + 3% DMSO + 2% Tween 80 + leveduras) (Escalante *et al.* 2008).

2.11. Atividade hemolítica

Usando tubos de EDTA, 10 ml de sangue humano fresco foram coletados de um doador (número de aprovação do comitê de ética 6.662.155), e centrifugados a 1000 g durante 10 minutos a 4°C. Após a remoção do plasma, o sedimento contendo os glóbulos vermelhos (RBCs) foi lavado cinco vezes com PBS e, em seguida, foi novamente suspenso em PBS para obter uma solução com 8% (v/v) de eritrócitos. Foram adicionadas alíquotas de 100 μ L desta suspensão em tubos de microcentrífuga, contendo 100 μ l óleo diluídos seriadamente, com concentrações variando de 0,01 a 20 mg/ml. Para Anfotericina B foram usadas as concentrações de 30 a 250 μ g/mL e para Fluconazol as concentrações de 1,5 a 6 mg/mL. As concentrações finais dos eritrócitos foram de 4% (v/v). Estas suspensões foram homogeneizadas em vortex e incubadas por 1 h a 37°C. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes foram transferidos

para placas de microdiluição de 96 poços, e a liberação de hemoglobina foi medida por absorvância a 540 nm. Foram utilizados Triton X-100 a 1% e 4% (v/v) de RBCs em PBS sem os óleos essenciais (não tratados) como controles positivo e negativo, respectivamente. O percentual de hemólise foi calculado como $[(\text{Abs } 540 \text{ nm tratado} - \text{Abs } 540 \text{ nm não tratado}) / (\text{Abs } 540 \text{ nm } 1\% \text{ Triton X-100} - \text{Abs } 540 \text{ nm não tratado})] \times 100$ e os experimentos foram realizados em triplicata (Cavalcante *et al.*, 2017).

2.12. Análise estatística

Os dados coletados neste estudo foram apresentados na forma de média aritmética, desvio padrão, gráficos, tabelas e imagens. Alguns dados ainda foram submetidos as análises estatísticas utilizando o software GraphPad® Prism versão 5, 4 para Windows (GraphPad software, San Diego California USA). Adotando o nível de significância de 0,05 ($p \leq 0,05$).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características do Óleo Essencial

A tabela 1 mostra as características físicas do óleo essencial extraído das folhas da canela coletadas no período de agosto de 2023. Observou-se no decorrer do processo de extração que o óleo não se mantinha por muito tempo acima da superfície d'água dentro do tubo graduado do aparelho dosador Clevenger, após certo tempo ele precipitava e depositava-se no fundo do tubo. Isso ocorreu porque o óleo apresenta densidade maior que a da água. Esse fenômeno foi também observado e brevemente descrito no estudo de Dias e colaboradores (2009), onde as propriedades químicas foram semelhantes às encontradas neste estudo.

Tabela 1. Características físicas do óleo essencial extraído das folhas da espécie *Cinnamomum verum*.

Características físicas	Óleo essencial
Densidade (g/ml)	1,3
Rendimento (%)	0,20
Cor	Levemente amarelado
Aparência	Límpido

Tais valores podem sofrer variações atribuídas a diversos fatores como à diferença de época de colheita/coleta, tipo e composição de solo, clima da região, umidade relativa do ar, no

dia da coleta/colheita (Cheng *et al.*, 2024). Esses fatores têm impacto direto na composição química e nas propriedades biológicas de ação dos constituintes do óleo essencial.

O óleo essencial obtido por meio de hidrodestilação das folhas de *C. verum* apresentou um perfil químico dominado pelo benzoato de benzila (93,6%), enquanto compostos foliares comumente encontrados como terpenoides e fenólicos (eugenol 0,37%, cinamaldeído 0,97% e linalol 1,94%) estiveram presentes em pequenas porcentagens, indicando um quimiotipo foliar atípico e raro, dentro da diversidade de quimiotipos para as folhas da espécie *C. verum*.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial de *Cinnamomum verum*

Classe compostos	RI	Ret. Time	Nome	Área			
				Injeção 1	Injeção 2	Média	DP
MH	930	14,105	α -pineno	0,320	0,321	0,321	0,001
MH	942	15,031	Camphene	0,220	0,223	0,222	0,002
MH	970	16,978	β -Pinene	0,229	0,257	0,243	0,020
MH	1024	20,817	p-Cimene	0,255	0,256	0,256	0,001
MO	1031	21,314	1,8-Cineol	0,191	0,190	0,191	0,001
MO	1100	26,248	Linalol	1,946	1,935	1,941	0,008
MO	1139	29,088	Canfora	0,134	0,135	0,135	0,001
MO	1160	30,719	Isomentona	0,656	0,652	0,654	0,003
MO	1174	31,611	Terpineno-4-ol	0,136	0,138	0,137	0,001
MO	1188	32,603	α -Terpineol	0,249	0,251	0,250	0,001
MO	1264	38,01	Cinamaldeido	0,970	0,965	0,968	0,004
MO	1300	40,50	Acetato de cinamilo	0,180	0,175	0,178	0,004
MO (fenólico)	1356	43,747	Eugenol	0,375	0,373	0,374	0,001
SH	1415	47,041	Beta-cariofileno	0,152	0,153	0,153	0,001
SO	1575	54,411	Oxido de cariofileno	0,186	0,182	0,184	0,003
SO	1580	54,633	Calarene	0,220	0,217	0,219	0,002
O	1770	61,974	Benzoato de benzila	93,580	93,575	93,578	0,004

Classe dos compostos		Área			
		Injeção 1	Injeção 2	Média	DP
MH	Hidrocarbonetos monoterpênicos	1,02	1,06	1,04	0,02
MO	Monoterpenos oxigenados	4,84	4,81	4,83	0,02
SH	Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	0,15	0,15	0,15	0,00
SO	Sesquiterpenos oxigenados	0,41	0,40	0,40	0,00
O	Outros Compostos fenólicos	93,58	93,58	93,58	0,00

Total	100,0	100,0	100,0	0,1
-------	-------	-------	-------	-----

Embora o quimiotipo foliar de *C. verum* seja comumente caracterizado pela presença de eugenol, a literatura descreve a existência de outro quimiotipo do óleo essencial das folhas, no qual o benzoato de benzila é o composto majoritário. Exemplos coletados em Santa Inês-MA apresentaram 95,3% de benzoato de benzila no óleo essencial das folhas (Farias *et al.*, 2020), um perfil químico semelhante ao observado neste estudo. Em contrapartida, outro estudo apresenta o cinamaldeído (35,6%) e eugenol (18,69%) como os principais constituintes do óleo essencial das folhas de *C. verum*, com benzoato de benzila representando somente 0,25% da composição total (Narayanankutty *et al.*, 2021). Essas diferenças estão associadas a condições ambientais, como estresse ambiental sofrido, condições climáticas extremas da região nordeste, e fatores físicos como poda indevida.

3.2. Atividade antimicrobiana

O óleo essencial de *C. verum* apresentou CIM entre 2,5 e 1,25 mg/mL para todos os isolados, inclusive para os resistentes a fluconazol (Tabela 3). O óleo apresentou efeito fungicida para todas as cepas testadas (Tabela 3).

Tabela 3. Atividade antifúngica do óleo essencial de *C. verum*, Anfotericina B e Fluconazol contra *C. albicans*.

<i>C. albicans</i>	Óleo essencial mg/mL		Anfotericina B µg/mL		Fluconazol µg/mL	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 90028	2,5	10	1,0	1,0	1	4
LABMIC 0102	2,5	10	0,5	0,5	1	8
LABMIC 0104	2,5	10	0,5	0,5	1	4
LABMIC 0105	2,5	10	0,5	0,5	1	4
LABMIC 0133	2,5	10	1,0	1,0	2	8
LABMIC C 16*	2,5	10	0,125	0,125	16	64
LABMIC C14*	1,25	5	0,125	0,125	8	32

*Cepas resistentes de acordo com os pontos de corte do EUCAST (<http://clinical.com/eucast/>) e CLSI (Performance standards for antifungal susceptibility of yeasts, 1st Ed. CLSI supplement M60. ISBN 1-56238 – 828 – 2 [Print]) que estabelecem CIM > 4 µg.ml⁻¹ para cepas de *C. albicans* resistente a fluconazol.

Efeito antifúngico superior foi obtido por Wijesinghe e colaboradores (2021), que encontraram CIMs nos valores de 1 mg/mL do óleo essencial das folhas contra *Candida albicans* e não-*albicans*. No entanto, as relações de CIM/CFM divergiram do nosso estudo, onde os autores encontraram relação de 1/2 de CIM/CFM e nosso estudo 1/4. Essa diferença pode ser justificada também pela composição, onde o estudo de Wijesinghe e colaboradores (2021) obtiveram um óleo com 77,22% de eugenol e somente 4,53% de benzoato de benzila. Portanto, a ação antifúngica pode variar de acordo com o quimiotipo do óleo essencial de *C. verum*. Embora esse seja o primeiro relato de atividade anti-*Candida* do quimiotipo benzoato de benzila, estudo anterior mostrou que o quimiotipo eugenol apresenta maior atividade antifúngica em relação ao quimiotipo benzoato de benzila quando testado contra o fitopatógeno *Colletotrichum musae* (Farias *et al.*, 2020).

3.3. Curva de morte

Para avaliação do tempo de ação dos compostos foi realizada a cinética de morte (Figura 2). Esse experimento determinou o tempo mínimo necessário para que o óleo essencial de *C. verum* promovesse a inativação ou morte das células planctônicas viáveis de *C. albicans*.

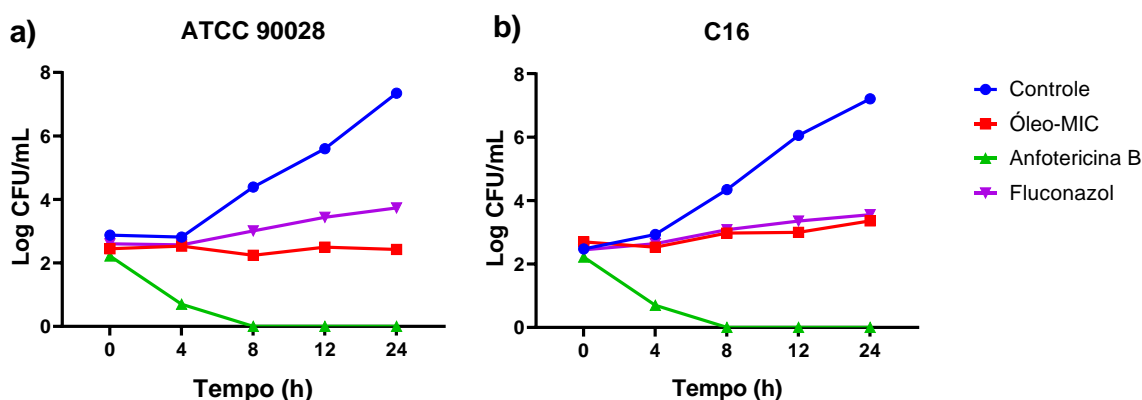


Figura 2. Curva de morte de *Candida albicans* ATCC 90028 (a) e *Candida albicans* C16 (b) tratadas com óleo essencial de *C. verum*, anfotericina B e Fluconazol.

De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial de *C. verum* não eliminou 100% das células de *C. albicans*, podendo observar no gráfico que óleo manteve o crescimento celular estável ao longo de 24 horas, demonstrando controle no desenvolvimento celular evitando a

fase logarítmica e mantendo ambas as cepas na fase estacionária, em comparação controle celular sem tratamento, apresentando efeito de caráter fungistático, característica observada no Fluconazol. Em contrapartida, Anfotericina B reduziu rapidamente os níveis de células viáveis após 4 horas, atingindo 100% na redução de crescimento no período de 8 horas de ação, confirmando o mecanismo rápido de ação do fármaco, que consiste na ligação ao ergosterol da membrana, com formação de poros que levam ao extravasamento do conteúdo celular.

Segundo o estudo de Wijesinghe e colaboradores (2021), no período de 6 horas houve redução de 100% de viabilidade das células de *C. albicans* utilizando o óleo de *C. verum* na concentração de 2 mg/ml. Os autores verificaram também danos na parede e extravasamento de material intracelular por microscopia nas células tratadas com o quimiotipo eugenol. No entanto, a literatura carece de estudos de mecanismos relacionados ao quimiotipo benzoato de benzila.

3.4. Checkerboard

Para avaliação do efeito combinatório do óleo com a Anfotericina B e o Fluconazol foi utilizado o método *checkerboard* que consiste em combinações de diferentes concentrações de ambos os compostos com objetivo de diminuir as concentrações inibitórias de um ou ambos os compostos. O óleo essencial de *C. verum* combinado com Anfotericina B apresentou efeito aditivo com ICIF de 0,75 para a cepa padrão ATCC 90028, onde a CIM (1 µg/mL) individual da Anfotericina B reduziu pela 2x chegando a concentração de (0,25 µg/mL) quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu pela metade quando combinado, reduzindo a CIM de 2,5 à 1,25 mg/mL, o óleo essencial de *C. verum* combinado com Fluconazol apresentou efeito aditivo com ICIF de 0,63 para a cepa padrão ATCC 90028, onde a CIM individual da Fluconazol reduziu pela metade de 1 µg/mL e chegando a concentração de 0,5 µg/mL quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu 6x quando combinado reduzindo a CIM de 2,5 para 0,312 mg/ml (Tabela 4).

Tabela 4. Efeito combinatório do óleo essencial associado à Anfotericina B e ao Fluconazol.

Cepas	<i>Cinnamomum verum</i>		Anfotericina B		ICIF	Efeito
	CIM	CIM mg/mL	CIM µg/mL	CIM µg/mL		
	mg/mL	(Combinado)	(Individual)	(Combinado)		
	(Individual)					

LABMIC C16	2,5	1,25	0,125	0,0312	0,75	Aditivo
ATCC 90028	2,5	1,25	1	0,25	0,75	Aditivo
Cepas	<i>Cinnamomum verum</i>		Fluconazol		ICIF	Efeito
	CIM	CIM	CIM $\mu\text{g/mL}$	CIM		
	mg/mL	mg/mL	(Individual)	$\mu\text{g/mL}$		
	(Individual)	(Combinado)		(Combinado)		
LABMIC C 16	2,5	0,312	16	4	0,37	Sinérgico
ATCC 90028	2,5	0,312	1	0,5	0,63	Aditivo

Óleo essencial de *C. verum* combinado com Anfotericina B apresentou efeito aditivo com ICIF de 0,75 para a cepa resistente C16, onde a CIM individual da Anfotericina reduziu 4x de 0,125 para 0,0312 $\mu\text{g/mL}$ quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu 1x quando combinado reduzindo a CIM de 2,5 à 1,25 mg/mL. Óleo essencial de *C. verum* combinado com Fluconazol apresentou efeito sinérgico com ICIF de 0,37 para a cepa resistente LABMIC C16, onde a CIM individual do Fluconazol reduziu 4x a CIM, que saiu de 16 $\mu\text{g/mL}$ para concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ quando combinada, enquanto a CIM do óleo reduziu 6x quando combinado.

A cepa LABMIC C16 apresenta resistência ao Fluconazol, e o efeito sinérgico observado indica que o óleo, por sua vez, possa atuar na sensibilização da membrana plasmática, promovendo a redução de fatores como o gradiente eletroquímico, que tem importante função para o funcionamento das bombas de efluxo. Em decorrência dos danos causados pelo óleo, podem favorecer acúmulo intracelular de Fluconazol, restaurando sua eficácia (Keereedach P *et al.*, 2020)

3.5. Atividade antibiofilme

Além de avaliar células planctônicas, o efeito do óleo essencial de *C. Verum* na adesão de biofilmes também foi investigado. Compostos capazes de inibir essa fase inicial são de grande relevância, pois impedem ou reduzem a porcentagem de adesão e conseqüentemente a formação de biofilmes. O EOCV demonstrou um efeito antiaderente significativo no biofilme de *C. albicans*, inibindo 89,7% da biomassa do biofilme da cepa ATCC 90028 em uma concentração de 4x CIM e reduzindo 76,4% da biomassa na concentração de 2x CIM e 75,9% no valor da CIM (Figura 3).

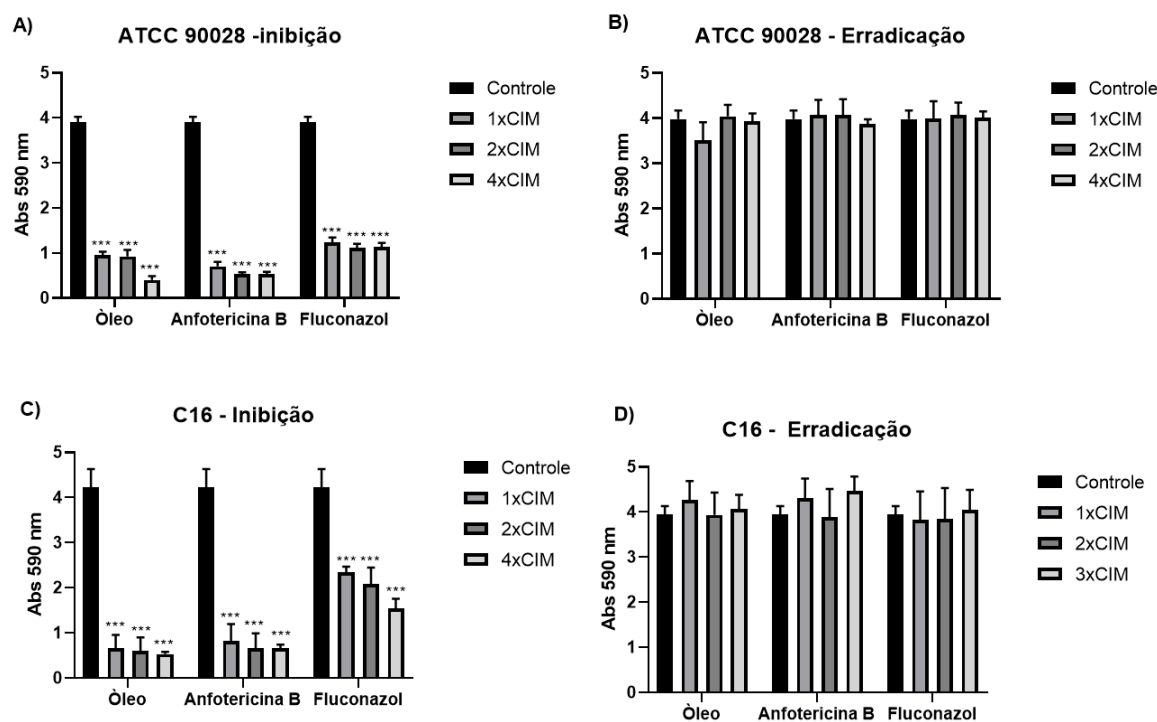


Figura 3. Atividade antibiograma no processo de adesão e biofilme maduro/formado do O.E, Anfotericina B e do Fluconazol.

O EOCS demonstrou um efeito antiaderente alto no biofilme da cepa C16, inibindo 87,4% da biomassa do biofilme em uma concentração de 4x CIM, 85,5% da biomassa na concentração de 2x CIM e 84,3% no valor da CIM. Anfotericina B apresentou redução significativa da adesão do biofilme de *C. albicans* em relação ao controle não tratado. No entanto, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos de 1xCIM, 2xCIM e 4xCIM, apresentando 80,5%, 84,2% e 84,3% entre esses tratamentos, respectivamente. O Fluconazol atuou de forma diferente, por conta da resistência apresentada pela cepa, houve uma menor redução da adesão em 4x CIM - 63,3%, 2x CIM - 50% e CIM - 45,2%.

Anfotericina B apresentou redução significativa da adesão do biofilme de *C. albicans* em relação ao controle não tratado. No entanto, não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos de 1xCIM, 2xCIM e 4xCIM, apresentando 82,1%, 86,4% e 86,4% entre esses tratamentos, respectivamente. O Fluconazol atuou de forma semelhante, reduzindo a adesão em 4x CIM - 71%, 2x CIM - 71,8% e CIM - 68,5%.

Na erradicação do biofilme maduro é possível observar que tanto o óleo quanto os antifúngicos não apresentaram efeito contra o biofilme de ambas as cepas em nenhuma das concentrações avaliadas (Figura 3).

3.6. Enzimas hidrolíticas

Além do biofilme, a produção de enzimas hidrolíticas são um fator de virulência importante em espécies de *Candida*. Nesse sentido, avaliamos a diferença de produção de enzimas entre uma espécie sensível (ATCC 90028) e uma cepa resistente a Fluconazol (C16) e o efeito do óleo essencial de *C. verum* sobre a inibição de proteinase, fosfolipase e hemolisina (Figura 4). Para as proteinases, a cepa ATCC 90028 apresentou atividade moderada ($Pz=0,71\pm0,12$), enquanto a cepa resistente a Fluconazol C16 não apresentou atividade proteásica. Quando avaliamos as fosfolipases, a cepa ATCC 90028 apresentou atividade de fosfolipase moderada ($Pz=0,71\pm0,05$), enquanto a cepa LABMIC C16 apresentou atividade fosfolipásica potente ($Pz=0,60\pm0,08$). Tanto o óleo, como os antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol foram capazes de inibir a atividade fosfolipásica para ambas as cepas.

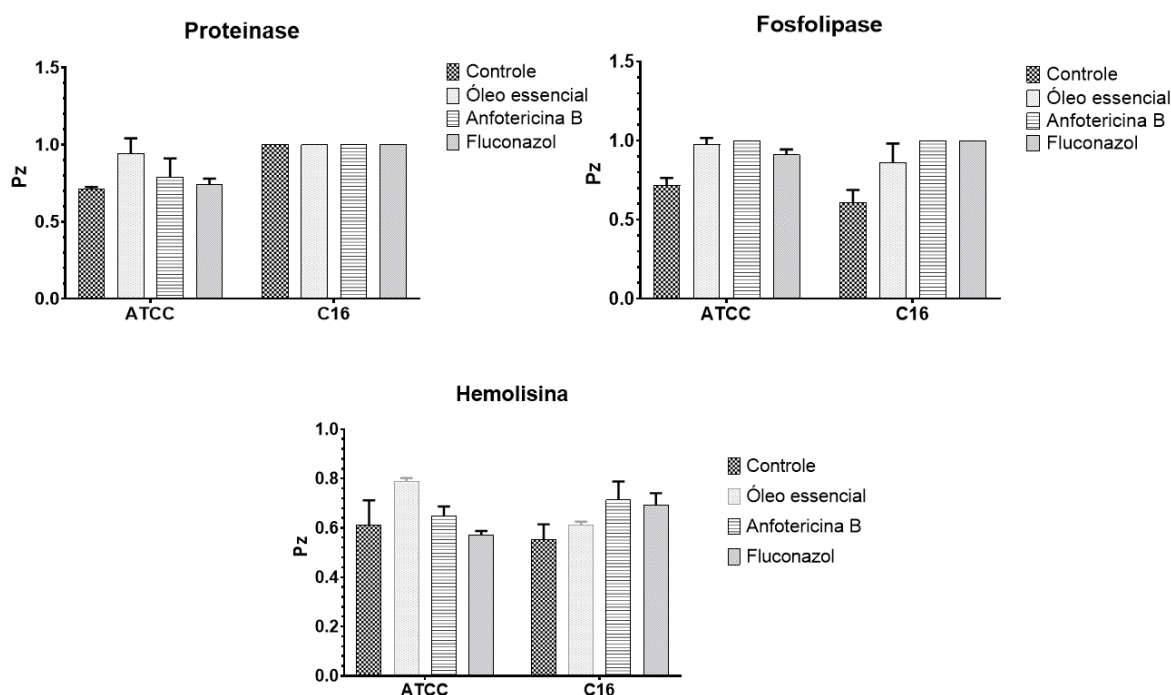


Figura 4. Efeito do óleo essencial de *C. verum* sobre enzimas hidrolíticas produzidas por *Candida albicans*. A atividade enzimática foi classificada em 5 grupos: ($Pz=1$) sem atividade, ($0,90 > Pz \leq 0,99$) atividade fraca, ($0,80 > Pz \leq 0,89$) atividade suave, ($0,70 > Pz \leq 0,79$) atividade moderada, ($Pz \leq 0,69$) atividade potente

É interessante notar que a cepa resistente modulou de forma seletiva a produção de fatores de virulência, onde a cepa resistente ao Fluconazol manteve a atividade fosfolipásica, porém não apresentou atividade proteínica. As fosfolipases estão associadas à interação com lipídios de membrana e à penetração celular (Lopes *et al.*, 2022), processos intimamente

relacionados às alterações estruturais que ocorrem em cepas resistentes aos azólicos. Em contrapartida, a expressão das proteinases secretadas (SAPs), envolvidas na degradação proteica do hospedeiro, pode ser reprimida como parte de um custo adaptativo, redirecionando recursos celulares para mecanismos de sobrevivência e manutenção da integridade da membrana.

Ambas as cepas apresentaram atividade hemolítica potente. A hemolisina atua na destruição de eritrócitos, facilitando a aquisição de ferro e a disseminação da infecção (Morgavero *et al.*, 2022). O tratamento com o óleo mostrou que essa atividade foi reduzida em ambas as cepas, com a cepa ATCC 90028 apresentando uma inibição da atividade maior ($0,61 \pm 0,02$) que os antifúngicos Anfotericina B ($Pz= 0,64 \pm 0,04$) e Fluconazol ($Pz=0,55 \pm 0,02$). Em contrapartida, a cepa C16 quando tratada com o óleo essencial de *C. verum* não apresentou alteração no seu poder hemolítico.

3.7. Mecanismo de ação por sorbitol e ergosterol

A investigação do mecanismo de ação do óleo essencial de *C. verum* se deu por meio dos ensaios com ergosterol e sorbitol, onde é possível avaliar os possíveis alvos celulares envolvidos em sua atividade antifúngica. O valor de CIM do óleo essencial de *C. verum* permaneceu inalterado na presença do ergosterol livre (Tabela 5). A alteração na CIM para Anfotericina B, confirma o mecanismo deste antifúngico de se ligar ao ergosterol da célula fúngica. Tal mecanismo resulta em perda da integridade celular e lise celular levando a célula fúngica a morte rápida, ação observada na curva de morte, que com 8 h de ação ocasionou morte de 100% de células fúngicas viáveis.

Tabela 5. Mecanismo de ação do óleo essencial de *C. verum* usando ergosterol 400 µg/mL e sorbitol a 0,8M.

Compostos	Ergosterol		Sorbitol	
	Antes	Depois	Antes	Depois
OE de <i>C. verum</i> (mg/mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Anfotericina B (µg/mL)	1,0	>128	-	-
Casposfungina (µg/mL)	-	-	0,125	>8

No ensaio com o protetor osmótico sorbitol também não ocorreu alteração da CIM, indicando que o mecanismo do óleo não é na parede celular fúngica. Desse modo, esses ensaios sugerem que o mecanismo antifúngico do composto esteja relacionado a mecanismos alternativos, como alteração da permeabilidade da membrana, podendo ser ocasionada pela inibição de precursores da composição da membrana fúngica, como ocorre nos azólicos ou ainda está relacionado à

indução de estresse oxidativo e/ou modulação das bombas. Esses mecanismos afetam a homeostase e inibe a proliferação das células fúngicas. Esses resultados estão de acordo com os encontrados na curva de morte, onde o óleo essencial apresentou um efeito fungistático, perfil compatível com a ausência de interação com ergosterol e β -glucanas, reforçando a hipótese de que o mecanismo de ação esteja associado à modulação de processos celulares essenciais à proliferação, e não a danos estruturais irreversíveis (Hou *et al.*, 2024; Leiva *et al.*, 2025).

3.8. Atividade Hemolítica

Para avaliar a toxicidade foi realizada a verificação do perfil de hemólise do óleo essencial das folhas de *C. verum*, dos antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol. Os dados apresentados na figura 5 mostram em relação ao óleo uma LC_{50} de 7,56 mg/mL equivalente a (7.560 μ g/mL), valor esse que chega a ser 3x maior que a concentração inibitória obtida. Já a Anfotericina B apresentou uma LC_{50} de 156 μ g/mL equivalente a 0,156 mg/ml, e o Fluconazol apresentou uma LC_{50} de aproximadamente 7,0 mg/mL.

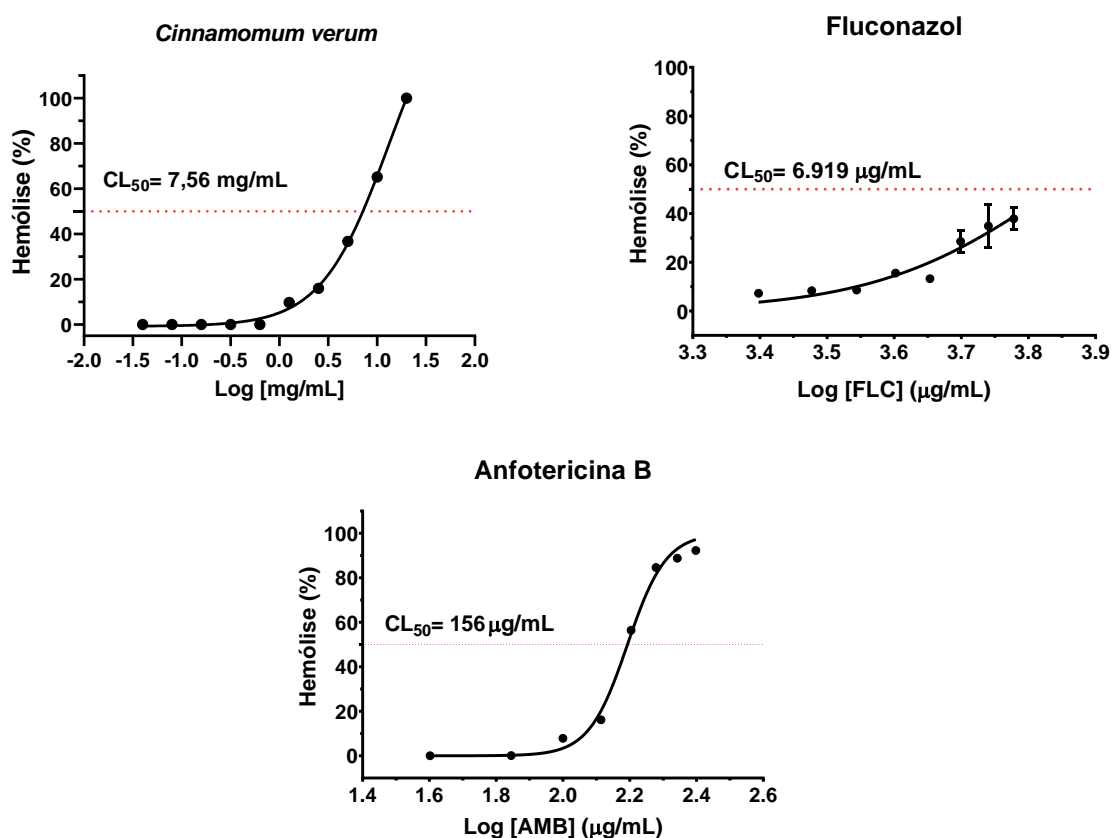


Figura 5. Atividade hemolítica do óleo essencial de *C. verum* e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol após 1 h de tratamento.

No estudo de Rangel e colaboradores 2018, avaliou-se a toxicidade por meio do método de hemólise, onde não apresentou toxicidade nas concentrações testadas. Perfil próximo à 50% da taxa de hemólise se apresentou em 2000 µg/mL, sendo essa concentração responsável por 40% da taxa de hemólise. Resultados de não toxicidade significativa também é apresentado por (Wijesinghe 2021), que avaliaram o perfil de citotoxicidade em células de queratinócitos humano (HacaT), apresentando ausência significativa de toxicidade, não apresentando inibição da viabilidade celular nas maiores concentrações testadas sendo utilizada até 1000 µg/mL. Resultado que corroboram com a toxicidade apresentada no presente estudo onde a concentração utilizada é até 7x para se obter uma LC₅₀.

4. CONCLUSÃO

Conclui-se que o óleo essencial extraído das folhas de *Cinnamomum verum* apresenta benzoato de benzila como composto majoritário, um quimiotipo foliar menos comum em relação aos perfis comumente descritos na literatura. Essa composição química influencia diretamente as propriedades biológicas do óleo, refletindo-se nas atividades antifúngicas observadas.

O óleo essencial demonstrou ação antifúngica significativa contra isolados de *Candida albicans*, incluindo cepas resistentes a Fluconazol, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 1,25 e 2,5 mg/mL. A cinética de morte indicou que o óleo possui efeito fungistático, mantendo as células na fase estacionária, em contraste com a ação rápida e fungicida da Anfotericina B. Os ensaios de combinação (Checkerboard) evidenciaram efeitos aditivos e sinérgicos quando o óleo foi associado a antifúngicos, sugerindo potencial para reduzir doses de fármacos e, possivelmente, contornar mecanismos de resistência, como o efluxo de drogas.

Além disso, o óleo essencial apresentou capacidade de inibição de biofilme, sendo mais eficiente na fase inicial de adesão das células, o que evidencia seu potencial de prevenir a formação de biofilmes e, conseqüentemente, reduzir a virulência e persistência das infecções. O tratamento com o óleo também modulou a atividade de enzimas hidrolíticas, incluindo fosfolipase, proteinase e hemolisina, reduzindo significativamente a virulência de isolados testados, especialmente a cepa sensível ATCC 90028.

Os estudos de mecanismo de ação sugerem que o efeito do óleo não está relacionado à ligação direta ao ergosterol da membrana, corroborando o caráter fungistático observado na curva de morte. A ausência de ação rápida típica de agentes que interagem com o ergosterol indica que outros mecanismos, possivelmente interferência em processos metabólicos ou na integridade da parede celular, podem ser responsáveis pela atividade antifúngica.

Por fim, a avaliação da toxicidade evidenciou que o óleo essencial possui baixa hemólise, sendo significativamente comparável ao Fluconazol em concentrações elevadas, reforçando sua segurança relativa e potencial aplicação clínica.

Em conjunto, os achados deste estudo demonstram que o óleo essencial de *Cinnamomum verum*, especialmente do quimiotipo rico em benzoato de benzila, apresenta propriedades antifúngicas promissoras contra *Candida albicans*, com potencial para uso como agente terapêutico complementar ou preventivo, principalmente em estratégias voltadas à inibição de biofilme e redução da virulência fúngica. Estudos futuros poderão explorar

mecanismos moleculares detalhados e avaliar a eficácia *in vivo*, consolidando o potencial farmacológico do óleo essencial desta espécie.

5. REFERÊNCIAS

ABERS, M., Schroeder, S., Goelz, L. *et al.* Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. **BMC Complement Med Ther** 21, 124 (2021). DOI:10.1186/s12906-021-03285-3

ARANTES SM *et al.* (2019). Toxicological and pharmacological properties of essential oils of *Calamintha nepeta*, *Origanum virens* and *Thymus mastichina* of Alentejo (Portugal). **Food Chem Toxicol**, 133, 110747, doi:10.1016/j.fct.2019.110747.

ARAÚJO JM, de Almeida Junior JN, Magri MMC, Costa SF, Guimarães T. Epidemiological Assessment and Risk Factors for Mortality of Bloodstream Infections by *Candida* sp. and the Impact of the COVID-19 Pandemic Era. **J Fungi** (Basel). 2024;10(4):268. Published 2024 Apr 3. DOI:10.3390/jof10040268.

ASSAGGAF H M. Investigating the antidiabetic properties of *Apium graveolens* extract and its inhibition of enzymes associated with hyperglycemia. **Int J Biol Macromol**. 2025;290:138873. DOI:10.1016/j.ijbiomac.2024.138873

BABUSHOK, V. I.; Linstrom, P. J.; Zenkevich, I. G. Retention Indices for Frequently Reported Compounds of Plant Essential Oils. **Journal of Physical and Chemical Reference Data**, v. 40, n. 4, p. 043101, 2011. DOI: 10.1063/1.3653552.

BUTNARIU, Nica; Sarac, Ioan. Óleos essenciais de plantas. **Revista de Biotecnologia e Ciências Biomédicas**, v. 1, n. 4, p. 35-43, 2018. DOI: 10.14302/issn.2576-6694.jbbs-18-2489.

CANELA, H. M. S. *et al.* Prevalence, virulence factors and antifungal susceptibility of *Candida* spp. isolated from bloodstream infections in a tertiary care hospital in Brazil. **Mycoses**, v. 61, n. 1, p. 11–21, 2018.

CAVALCANTE, Carolina Sidrim P. *et al.* Atividade antifúngica de Ctn [15–34], o fragmento peptídico C-terminal da crotalicidina, uma catelicidina da glândula de veneno de cascavel. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 3, p. 231–237, 2017.

CHENG Y, Fu Y, Gu D, *et al.* Seasonal Variation in Chemical Composition and Antioxidant and Antibacterial Activity of Essential Oil from *Cinnamomum cassia* Leaves. **Plants (Basel)**. 2024;14(1):81. Published 2024 Dec 30. doi:10.3390/plants14010081.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

DIAS, Vera Lúcia Neves. **Fitodisponibilidade de metais, caracterização nutricional, constituição química, avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas de *Cinnamomum zeylanicum* Breyn.** 2009. 115 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

ESCALANTE, A.; Gattuso, M.; Pérez, P.; Zacchino, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. **Journal of Natural Product**, v. 71, n. 10, p. 1710–1725, 2008.

FARIAS APP, Monteiro ODS, da Silva JKR, Figueiredo PLB, Rodrigues AAC, Monteiro IN, Maia JGS. Chemical composition and biological activities of two chemotype-oils from *Cinnamomum verum* J. Presl growing in North Brazil. **J Food Sci Technol**. 2020 Sep;57(9):3176-3183. DOI: 10.1007/s13197-020-04288-7.

FONTENELLE, R. O. S.; Morais, S. M.; Brito, E. H. S.; Kerntopf, M. R.; Brilhante, R. S. N.; Cordeiro, R. A.; Tomé, A. R.; Queiroz, M. G. R.; Nascimento, N. R. F.; Sidrim, J. J. C. *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 934–940, 2007.

GAFFAR, N. R.; Valand, N.; Venkatraman Girija, U. C. Candidiasis: Insights into virulence factors, complement evasion and antifungal drug resistance. **Microorganisms**, v. 13, n. 2, p. 272, 2025. DOI: 10.3390/13020272.

HOU GW, Huang T. Essential oils as promising treatments for treating *Candida albicans* infections: research progress, mechanisms, and clinical applications. **Front Pharmacol.** 2024;15:1400105. Published 2024 May 15. DOI:10.3389/fphar.2024.1400105

JOHNSON, Melissa D. *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693–715, 2004.

KEEREEDACH, P.; Hrimpeng, K.; Boonbumrung, K. Antifungal activity of Thai Cajuput oil and its effect on efflux-pump gene expression in fluconazole-resistant *Candida albicans* clinical isolates. **International Journal of Microbiology**, 2020;2020:5989206. Published 2020 Nov 4. DOI:10.1155/2020/5989206.

KIM NY, Kim S, Park HM, *et al.* *Cinnamomum verum* extract inhibits NOX2/ROS and PKC δ /JNK/AP-1/NF- κ B pathway-mediated inflammatory response in PMA-stimulated THP1 monocytes. **Phytomedicine**. 2023;112:154685. DOI:10.1016/j.phymed.2023.154685.

KWOLEK-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Res.** 2014;14(7):1068-1079. doi:10.1111/1567-1364.12202.

LEIVA-Mora M *et al.* Mecanismos antifúngicos de óleos essenciais de plantas: uma revisão abrangente da literatura para o desenvolvimento de biofungicidas. **Agricultura** . 2025; 15(21):2303. DOI: <https://doi.org/10.3390/agriculture15212303>

LI Y, Hind C, Furner-Pardoe J, Sutton JM, Rahman KM. Understanding the mechanisms of resistance to azole antifungals in *Candida* species. **JAC Antimicrob Resist.** 2025;7(3):dlaf106. Published 2025 Jun 23. DOI:10.1093/jacamr/dlaf106.

LOPES JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence.** 2022;13(1):89-121. DOI:10.1080/21505594.2021.2019950.

MALLICK, D. C.; Kaushik, N.; Goyal, L.; Mallick, L.; Singh, P. A Comprehensive Review of Candidemia and Invasive Candidiasis in Adults: Focus on the Emerging Multidrug-

Resistant Fungus *Candida auris*. **Diseases**, v. 13, n. 4, p. 93, 2025.

DOI: 10.3390/diseases13040093.

MAMDOUH, Diaa; Smetanska, Iryna. Otimização de culturas de calos e suspensão de células de *Lycium schweinfurthii* para produção melhorada de fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante. **Horticulturae**, v. 8, n. 5, p. 394, 2022.

MCHUGH, Mary L. Multiple comparison analysis testing in ANOVA. **Biochemia Medica** (Zagreb), v. 21, n. 3, p. 203–209, 2011. DOI: 10.11613/BM.2011.029.

MEHANI, T.; Sedky, A. F.; El-Sharkawy, E. A.; El-Banna, A. A. Methodology for Extraction of Essential Oils: A Review. **International Journal for Multidisciplinary Research (IJFMR)**, v. 5, n. 4, p. 1–10, 2023.

MORGAVERO S, Höfs S, Lauer AN, Müller R, Brunke S, Allert S, Gerwien F, Groth S, Dolk E, Wilson D, *et al.* Candidalysin Is the Hemolytic Factor of *Candida albicans*. **Toxins**. 2022; 14(12). DOI:10.3390/toxins14120874.

NARAYANANKUTTY A, Kunnath K, Alfarhan A, Rajagopal R, Ramesh V. Chemical Composition of *Cinnamomum verum* Leaf and Flower Essential Oils and Analysis of Their Antibacterial, Insecticidal, and Larvicidal Properties. **Molecules**. 2021;26(20):6303. 2021 Oct 19. DOI:10.3390/molecules26206303.

NATH, A.; Saha, P.; Roy, S.; *et al.* Essential oils as natural bioactive compounds: chemical composition, biological activities and applications. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, 2024.

OLIVEIRA, V. M. C. *et al.* *Lactobacillus* is able to alter the virulence and the sensitivity profile of *Candida albicans*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 6, p. 1737–1744, 2016.

PAGLIARI, S.; Forcella, M.; Lonati, E.; Sacco, G.; Romaniello, F.; Rovellini, P.; Fusi, P.; Palestini, P.; Campone, L.; Labra, M.; Bulbarelli, A.; Bruni, I. Antioxidant and antiinflammatory effect of cinnamon (*Cinnamomum verum* J. Presl) bark extract after in vitro digestion simulation. **Foods**, v. 12, n. 3, p. 452, 2023.

PANDUR E *et al.* (2022). Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects of Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Essential Oils Prepared at Different Plant Phenophases on *Pseudomonas aeruginosa* LPS-Activated THP-1 Macrophages. *Antioxidants* (Basel), 11, 2022. DOI:10.3390/antiox11071330.

PORRELLO, Antonella; Vaglica, Alessandro; Savoca, Dario; Bruno, Maurizio; Sottile, Francesco. Variability in *Crithmum maritimum* L. essential oils' chemical composition: PCA analysis, food safety, and sustainability. **Sustainability**, v. 16, n. 6, p. 2541, 2024. DOI: 10.3390/su16062541.

PRICE, M. F.; Wilkinson, I. D.; Gentry, L. O. Plate method for detection of phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia: Journal of Medical and Veterinary Mycology**, v. 20, n. 1, p. 7–14, 1982.

RANGEL ML, de Aquino SG, de Lima JM, Castellano LR, de Castro RD. *In Vitro* Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume Essential Oil on *Candida* spp. Involved in Oral Infections. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2018;2018:4045013. Published 2018 Oct 17. DOI:10.1155/2018/4045013

SANTOS, José Roberto Dantas de Andrade; Lima, Edeltrudes de Oliveira; Galvão, José Lucas Ferreira Marques; Oliveira Filho, Abrahão Alves de. Tratamento e manejo clínico das candidíases: uma breve revisão da literatura. **Revista Brasileira de Educação e Saúde**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 651–657, 2024. DOI: 10.18378/rebes.v14i3.10540.

SILVA, Kevin Gustavo dos Santos *et al.* *Candida albicans*: fatores de virulência, patogênese e formas de diagnóstico e controle de sua infecção. **Research, Society and Development**, [S.l.], v. 13, n. 1, p. e6413144781, 2024. DOI:10.33448/rsd-v13i1.44781.

SPENCE, Charles. Nutmeg and mace: The sweet and savoury spices. **International Journal of Gastronomy and Food Science**, v. 36, p. 100936, 2024. DOI:10.1016/j.ijgfs.2024.100936.

TAFF, H. T.; Nett, J. E.; Andes, D. R. Comparative analysis of *Candida* biofilm quantitation assays. **Medical Mycology**, v. 50, n. 2, p. 214–218, 2012.

WIJESINGHE GK, de Oliveira TR, Maia FC, *et al.* Efficacy of true cinnamon (*Cinnamomum verum*) leaf essential oil as a therapeutic alternative for *Candida* biofilm infections. **Iran J Basic Med Sci.** 2021;24(6):787-795. DOI:10.22038/ijbms.2021.53981.12138.

WIJESINGHE GK, Maia FC, de Oliveira TR, *et al.* Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the in-vivo toxicity with *Galleria mellonella* model. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 2020;115:e200349. Published 2020 Sep 25. DOI:10.1590/0074-02760200349.