



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

**MARIA ALYCE ALBUQUERQUE FERNANDES**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Citrus***  
***limon* (L.) Burm. f. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck CONTRA CEPAS DE *Candida***  
***albicans* NA FORMA PLANCTÔNICA E DE BIOFILME**

**SOBRAL - CE**

**2026**

**MARIA ALYCE ALBUQUERQUE FERNANDES**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Citrus limon* (L.) Burm. f. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck CONTRA CEPAS DE *Candida albicans* NA FORMA PLANCTÔNICA E DE BIOFILME**

Dissertação apresentada ao mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Ceará (UFC) como requisito 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: Profa. Dra. Francisca Lidiane Linhares de Aguiar.

**SOBRAL - CE**

**2026**

**MARIA ALYCE ALBUQUERQUE FERNANDES**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS DE *Citrus limon* (L.) Burm. f. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck CONTRA CEPAS DE *Candida albicans* NA FORMA PLANCTÔNICA E DE BIOFILME**

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

Aprovada em 26/02/2026.

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Profa. Dra. Francisca Lidiane Linhares de Aguiar – Coorientadora  
Universidade Estadual Vale do Acaraú – (UVA)

---

Dr. Filipe Nobre Chaves – 1º Examinador (Interno)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Dra. Maria Gleiciane Soares Coutinho – 2º Examinadora (Externa)  
Universidade Estadual Vale do Acaraú – (UVA)

## AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES). À Capes, pela bolsa de mestrado, que foi fundamental para a realização de minha pesquisa e para me manter com dedicação exclusiva ao mestrado. Muito obrigada.

A Deus por cuidar da minha mente e me dar forças mesmo nas adversidades. A minha família pelo suporte e apoio todos os dias a cada novo desafio ao longo desse trajeto. Em especial, quero agradecer à minha mãe, Joana, minha base e minha âncora, que nunca mede esforços para me ajudar. Aos meus irmãos, Leo e Andrey, que sempre estão comigo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle, por sua orientação, apoio, paciência e palavras de motivação ao longo desses dois anos de mestrado. Ser sua orientanda desde a graduação é uma honra. À minha co-orientadora, Dra. Francisca Lidiane Linhares de Aguiar, por sua orientação, paciência, apoio e cuidado, e por sempre ter estado comigo em cada passo na execução dos experimentos. A vocês duas, meu muito obrigada e minha admiração, como pessoas, mulheres, pesquisadoras e professoras.

À Lidiane Linhares, Lídia, agora como amiga. Muito obrigada por me ajudar em tudo, por ter me ensinado muito na pesquisa, por cada ato de motivação que me deu quando eu estava triste e desacreditada. E por sua amizade fora da vida acadêmica. Conto com você nos futuros projetos. Ao Pedro Henrique, por ser meu amigo e parceiro de pesquisa desde a graduação, por me ajudar e sempre ter estado comigo em tudo nesses dois anos que caminhamos juntos como mestrados. Vocês dois são amigos valiosos e tornaram este caminho mais fácil e mais divertido.

Aos meus colegas do LABMIC - UVA e Laboratório de Microbiologia - UFC, por toda ajuda e parceria diária nos laboratórios. Aos amigos que fiz no mestrado, também meu muito obrigada por cada momento de descontração. A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento e execução do meu projeto de mestrado. Muito obrigada a todos!

*“Nunca seja tão gentil, que se esqueça de ser inteligente.  
nunca seja tão inteligente, que se esqueça de ser gentil.”*  
*Marjorie - Taylor Swift*

“Vá devagar, você está indo bem.  
Você não pode ser tudo o que quer ser antes do seu tempo.”  
Vienna - Billy Joel

## RESUMO

*Candida albicans* é um patógeno oportunista que pode causar infecções no hospedeiro por meio de seus fatores de virulência. As poucas opções antifúngicas promovem buscas por alternativas terapêuticas, e os óleos essenciais se destacam por seus potenciais antifúngicos, como os do gênero *Citrus*. O estudo foi realizado na região norte do estado do Ceará, por meio de parcerias entre instituições, fortalecendo a inovação regional e o potencial da bioprospecção de produtos naturais na microbiologia com uso de plantas cultivadas na região, apresentando assim resultados importantes nas áreas biotecnológica e da saúde. Este estudo analisou a composição química, a atividade antifúngica contra *Candida albicans* nas formas planctônica e de biofilme, a citotoxicidade em eritrócitos humanos e as propriedades farmacocinéticas dos óleos essenciais de *Citrus limon* e *Citrus sinensis*. Os óleos essenciais foram extraídos das folhas por hidrodestilação e sua composição foi analisada por GC-MS. A atividade antifúngica foi avaliada por meio de microdiluição em caldo e cinética de morte. Os efeitos combinados foram avaliados pelo *Checkerboard*, enquanto os testes antibiofilme foram avaliados por meio de ensaios em placas e microscopia. Os testes de atividade hemolítica foram realizados utilizando a porcentagem de hemólise. Os óleos essenciais apresentaram o limoneno (40,81-36,69%) como constituinte majoritário. A Concentração Inibitória Mínima foi de 0,312–1,25 mg/mL, com cinética de morte de até 10 h. Apresentou efeitos aditivo (*C. limon*/fluconazol) e sinérgico (*C. sinensis*/fluconazol). Exibiu efeitos antiadesão e antipolimorfismo, inibindo a formação de biofilme. Também exibiram baixa citotoxicidade, com  $CL_{50}$  de 14.000-13.000  $\mu$ g/mL. As predições farmacocinéticas ADMET e *BOILED-Egg* indicaram segurança para uso sistêmico. Ambos os óleos essenciais exibiram forte atividade anti-*Candida* com citotoxicidade mínima. Seus efeitos aditivos/sinérgicos com o fluconazol destacam seu potencial como terapia alternativa ou adjuvante contra infecções por *C. albicans*.

**Palavras-chave:** virulência; atividade antifúngica; atividade hemolítica; farmacocinética.

## ABSTRACT

*Candida albicans* is an opportunistic pathogen that can cause infections in its host through its virulence factors. The limited antifungal options have led to a search for therapeutic alternatives, and essential oils, such as those from the *Citrus* genus, stand out for their antifungal potential. The study was conducted in the northern region of the state of Ceará, through partnerships between institutions. It strengthens regional innovation and the potential of bioprospecting natural products in microbiology using plants cultivated in the region, thus presenting important results in the areas of biotechnology and health. This study analyzes the chemical composition, antifungal activity against *Candida albicans* in planktonic and biofilm forms, cytotoxicity in human erythrocytes, and pharmacokinetic properties of essential oils from *Citrus limon* and *Citrus sinensis*. The essential oils were extracted from the leaves by hydrodistillation, and their composition was verified by GC-MS. Antifungal activity was evaluated using broth microdilution and death kinetics. Combined effects were assessed using the Checkerboard method, while antibiofilm tests were evaluated using plate assays and microscopy. Hemolytic activity tests were performed using a percentage of hemolysis. The essential oils contain limonene (40.81-36.69%) as the major constituent. The Minimum Inhibitory Concentration was 0.312–1.25 mg/mL, with a killing kinetic of up to 10 h. It showed additive (*C. limon*/fluconazole) and synergistic (*C. sinensis*/fluconazole) effects. It exhibited anti-adhesion and anti-polymorphism effects, initiating biofilm formation. It also exhibited low cytotoxicity, with an LC<sub>50</sub> of 14,000-13,000 µg/mL. ADMET and BOILED-Egg pharmacokinetic predictions indicated safety for systemic use. Both essential oils exhibited strong anti-*Candida* activity with minimal cytotoxicity. Their additive/synergistic effects with fluconazole highlight their potential as an alternative or adjuvant therapy against *C. albicans* infections.

**Keywords:** virulence; antifungal activity; hemolytic activity; pharmacokinetics.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Morfologias de <i>Candida albicans</i>	20
Figura 2 -	Mudança branco-opaco ( <i>White-Opaque switching</i> ) de <i>C. albicans</i>	20
Figura 3 -	Biofilme de <i>C. albicans</i>	23
Figura 4 -	Folhas de <i>Citrus limon</i>	31
Figura 5 -	Folhas de <i>Citrus sinensis</i>	33
Figura 6 -	Exsiccatas das plantas <i>C. limon</i> e <i>C. sinensis</i>	36
Figura 7 -	Processo de extração dos óleos essenciais	37
Figura 8 -	Desenho esquemático da metodologia de Microdiluição em Caldo	39
Figura 9 -	Desenho esquemático da metodologia de Cinética do Tempo de Morte	40
Figura 10 -	Desenho esquemático da metodologia de <i>Checkerboard</i>	41
Figura 11 -	Desenho esquemático da metodologia de Quantificação Total da Biomassa da adesão	42
Figura 12 -	Desenho esquemático da metodologia de Quantificação Total da Biomassa madura	42
Figura 13 -	Desenho esquemático da metodologia dos efeitos dos óleos essenciais sobre a morfologia da adesão	43
Figura 14 -	Desenho esquemático da metodologia dos efeitos dos óleos essenciais sobre a morfologia do biofilme maduro	44
Figura 15 -	Desenho esquemático da metodologia de atividade hemolítica	45
Figura 16 -	Curvas de morte e formação de colônias de <i>C. albicans</i>	49
Figura 17 -	Ensaio da inibição da adesão de <i>C. albicans</i>	52
Figura 18 -	Ensaio da erradicação do biofilme maduro de <i>C. albicans</i>	54
Figura 19 -	Predição <i>BOILED-Egg</i> dos compostos dos óleos essenciais	60

## LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Índices de inibição da adesão e erradicação do biofilme maduro de *C. albicans* 52
- Gráfico 2 - Índices de hemólise da atividade hemolítica dos óleos essenciais e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol 55

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Cruzamentos entre espécies de <i>Citrus</i>	30
Tabela 2 -	Atividade antimicrobiana de <i>C. limon</i> extraído de cascas e folhas.	31
Tabela 3 -	Atividade antimicrobiana de <i>C. sinensis</i> extraído de cascas e folhas.	33
Tabela 4 -	Composição química dos óleos essenciais de <i>Citrus</i>	47
Tabela 5 -	Resultado da atividade dos óleos essenciais de <i>Citrus</i> e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol contra cepas de <i>C. albicans</i>	48
Tabela 6 -	Teste de <i>checkerboard</i> dos óleos essenciais <i>Citrus</i> combinados com os antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol, e combinados entre si contra a cepa ATCC 90028	51
Tabela 7 -	Predição ADME dos compostos majoritários de <i>Citrus</i>	57

## ABREVIACOES E ACRONIMOS

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
CL	<i>Citrus limon</i>
CL <sub>50</sub>	Concentrao letal 50
CS	<i>Citrus sinensis</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EDTA	cido Etilenodiamino Tetra-Acético
FLC	Fluconazol
GC-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
ICIF	ndice de Concentrao Inibitória Fracionada
IR	ndice Refrativo
LABMIC	Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual Vale do Acaraú
MOPS	cido 3-[N-Morfolino] propanosulfnico
OE <sub>s</sub>	leos Essenciais
OECL	leo essencial de <i>Citrus limon</i>
OECS	leo essencial de <i>Citrus sinensis</i>
OMS	Organizao Mundial da Saúde
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SDA	Sabouraud Dextrose Agar
spp	Espécie
UVA	Universidade Estadual Vale do Acaraú

## LISTA DE SÍMBOLOS

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

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>14</b>
<b>2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>16</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>Candida</i> spp.....	17
3.2. <i>Candida albicans</i> .....	19
3.3. Biofilme.....	22
3.4. Citotoxicidade e resistência antifúngica.....	24
3.5. Produtos naturais.....	27
3.6. Óleos essenciais.....	28
3.7. Gênero <i>Citrus</i> .....	29
3.8. <i>Citrus limon</i> (L.) Burm. f. e <i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck.....	31
<b>4 OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
4.1. Objetivo geral.....	35
4.2. Objetivos específicos.....	35
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
5.1. Coleta botânica.....	36
5.2. Extração dos óleos essenciais.....	36
5.3. Análise dos componentes químicos dos óleos essenciais.....	37
5.4. Cepas de <i>Candida albicans</i> .....	37
5.5. Método de microdiluição em caldo.....	38
5.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	38
5.5.2. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM).....	38
5.6. Cinética do tempo de morte.....	39
5.7. <i>Checkerboard</i> .....	40
5.8. Ensaio de inibição do biofilme.....	41
5.9. Efeito dos óleos de <i>Citrus</i> sobre a morfologia de <i>Candida albicans</i> .....	43
5.10. Atividade hemolítica.....	44
5.11. Análise estatística.....	45
5.12. Farmacocinética.....	45
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>47</b>
6.1. Óleos essenciais.....	47
6.2. Microdiluição em caldo.....	48
6.3. Cinética do tempo de morte.....	49
6.4. <i>Checkerboard</i> .....	50
6.5. Ensaio de inibição do biofilme.....	51
6.6. Efeitos dos óleos de <i>Citrus</i> sobre a morfologia de <i>Candida albicans</i> .....	52
6.7. Atividade hemolítica.....	55
6.8. Farmacocinética.....	56
<b>7 CONCLUSÃO.....</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>62</b>

<b>ANEXOS.....</b>	<b>78</b>
ANEXO A - Gráficos dos perfis cromatográficos dos óleos essenciais.....	78
ANEXO B - Comitê de ética para realização do teste de atividade hemolítica.....	79
ANEXO C - Artigo de revisão publicado na revista <i>Frontiers in Fungal Biology</i> , fator de impacto de 3.8.....	82
ANEXO D - Artigo experimental aceito para publicação na revista <i>Planta Medica</i> , fator de impacto 2.....	88

## 1 INTRODUÇÃO

*Candida albicans* é uma levedura polimórfica que possui a capacidade de alternar sua morfologia de levedura para a forma filamentososa. A espécie coloniza a microbiota humana, desempenhando funções importantes para a manutenção do equilíbrio interno do hospedeiro, mas é oportunista, tornando-se patogênica quando há um desequilíbrio no binômio parasita-hospedeiro. Na literatura, são descritas 15 espécies do gênero *Candida* identificadas como patógenos humanos, sendo *C. albicans* a espécie mais prevalente dentre as cepas isoladas em pacientes com candidemias (Xiao *et al.*, 2020; D'Enfert *et al.*, 2021).

As infecções causadas por *C. albicans* são oportunistas e ocorrem quando seus fatores de virulência são desencadeados. A virulência de *C. albicans* são eventos multifatoriais que podem se complementar, como a mudança de morfologia, formando hifas e pseudohifas, a produção de enzimas hidrolíticas, as proteínas de adesão, as adesinas que ajudam as células fúngicas a aderirem às células dos hospedeiros e aos dispositivos médicos. E a capacidade de invasão nas células do hospedeiro e, posteriormente, a formação do biofilme (D'Enfert *et al.*, 2021; Hong *et al.*, 2024).

Os biofilmes são comunidades microbianas organizadas formadas por uma única espécie ou por multiespécies, que estão aderidas a substratos bióticos ou abióticos, envoltas por uma matriz extracelular, que é composta por substâncias polissacarídicas produzidas pelas próprias células, que as protegem de estresses externos, e depois de maduros, os biofilmes liberam células planctônicas para que possam iniciar novos sítios de infecções, dificultando assim a ação dos fármacos e podendo proporcionar resistência aos antimicrobianos (Ugwu *et al.*, 2025). O biofilme de *C. albicans* apresenta células com morfologia de hifas e/ou pseudohifas, formando uma estrutura tridimensional, a mudança de morfologia das células na fase de biofilme aumenta a proteção do biofilme tornando a infecção mais persistente (Abdulghani *et al.*, 2022; Ashrit *et al.*, 2022).

O tratamento antifúngico é difícil e demorado devido a limitação terapêutica, onde existem apenas quatro classes de antifúngicos, os compostos azólicos, polienos, equinocandinas e análogos da pirimidina, e os relatos de resistência antifúngica, principalmente aos de primeira linha de tratamento, como os compostos azólicos, estão mais frequentes, o que diminui as opções terapêuticas. A outra problemática é a toxicidade dos antifúngicos ao corpo humano, devido a similaridade celular das células humanas e fúngicas (Chen *et al.*, 2023; Susan *et al.*, 2025).

O aumento da resistência antimicrobiana alertou para a busca por alternativas ou complementos terapêuticos para tratar as infecções, e essas alternativas estão sendo achadas nos produtos naturais que são ricos em atividades biológicas. Dentre os produtos naturais advindos de plantas medicinais estão os óleos essenciais. Os óleos essenciais são substâncias complexas formadas por combinações de compostos voláteis por meio do metabolismo secundário das plantas. A composição química e a quantidade de princípios ativos encontrados são influenciados por diversos fatores bióticos e abióticos, como o genótipo da espécie, as características do solo e as condições climáticas, assim como as diferentes partes anatômicas das plantas, podem influenciar a concentração dos compostos presentes nos óleos essenciais (Laftouhi *et al.*, 2023; Abdelmohsen; Elmaidomy, 2025).

As espécies *Citrus limon* (L.) Burm. f. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck, popularmente conhecido como limão siciliano e a laranja doce, respectivamente, pertencem ao gênero *Citrus* que é conhecido por usos na medicina tradicional de várias culturas, sendo fontes ricas em vitamina C e por serem espécies com forte aroma, o que é um indicativo de constituintes químicos de óleos essenciais (Zibae *et al.*, 2020; Zahr *et al.*, 2023). Os óleos essenciais de *Citrus* apresentam múltiplas atividades biológicas documentadas na literatura, incluindo efeitos antibacterianos, antivirais, fungicidas e antioxidantes, devido serem ricos em flavonoides, compostos voláteis, cumarinas e pectinas. O principal constituinte encontrado nos óleos essenciais desse gênero é o monoterpeno limoneno (Agarwal *et al.*, 2022; El Hachlafi *et al.*, 2024; Deka *et al.*, 2025).

Considerando os problemas de resistência antifúngica e toxicidade que reduzem o sucesso no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, pesquisa com óleos essenciais para avaliar suas atividades antifúngicas direcionadas a fatores de virulência são importantes e interessante para a busca de terapias antifúngicas alternativas.

## 2 RELEVÂNCIA E JUSTIFICATIVA

O direcionamento de pesquisas sobre os fatores de virulência de *C. albicans* se justificam pela atuação dos mesmos na patogenicidade oportunista da espécie. A inibição ou bloqueio da virulência impede *C. albicans* de disseminar infecções oportunistas sistêmicas no hospedeiro, a mantendo na forma comensal mesmo se houver desequilíbrio imunológico no organismo do hospedeiro. Se a infecção for tratada no início haverá a redução do tempo de tratamento e eventuais internações resultando em melhores condições para o paciente.

Embora existam estudos com óleos essenciais das folhas de *C. limon* e *C. sinensis* contra *C. albicans*, há necessidade de mais pesquisas para avaliar mais do seu espectro de ação contra essa espécie. E assim, ser comprovado como um produto natural seguro para complementar no tratamento de infecções fúngicas causadas por *C. albicans*. Além disso, os óleos essenciais deste estudo são de espécies cultivadas no nordeste do Brasil, sendo o Brasil um dos maiores produtores mundiais de *Citrus*, e que a composição química dos óleos essenciais varia de acordo com a localização geográfica, o que pode aumentar ou diminuir sua atividade.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1. *Candida* spp.

O gênero *Candida* é considerado um dos grupos mais diversos dos fungos, onde originalmente as espécies iam sendo isoladas e identificadas por serem leveduras formadoras colônias brancas e aparentadas morfologicamente, com isso o gênero tem passado por recorrentes reclassificações para atender aos critérios taxonômicos e devido a essas mudanças, muitas espécies além de serem realocadas em novos clados, também foram renomeadas e subdivididas (Kidd; Abdolrasouli; Hagen, 2023). As principais espécies de interesse clínico são, majoritária a *Candida albicans* sendo a mais isolada, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Nakaseomyces glabrata*, *Pichia kudriavzevii* e a espécie multirresistente, *Candidozyma auris* (Pappas *et al.*, 2018; Bing *et al.*, 2024; Ferngren *et al.*, 2024; Mallick *et al.*, 2025). Um gênero de patógenos oportunistas, com uma variabilidade de fatores de virulência como, a produção de enzimas hidrolíticas, adesinas, dimorfismo e polimorfismo, e a formação de biofilme, são uma das principais causas de infecções fúngicas oportunistas associadas aos cuidados de saúde (Mroczyńska; Brillowska-Dąbrowska, 2021; Makled *et al.*, 2024).

Em 2022 a Organização Mundial de Saúde (OMS), publicou uma lista com as 19 principais espécies fúngicas de grande ameaça à saúde pública, sendo destacado a problemática da recorrência de infecções, a carência de diagnósticos rápidos e aumento nos casos de resistência antifúngica, uma vez que o arsenal antifúngico já é reduzido. Dos patógenos fúngicos incluídos, há espécies de *Candida* nos três grupos. No grupo de risco crítico há a *C. auris* e *C. albicans*. No grupo de alto risco a *N. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis*. E no grupo de médio risco, a *P. kudriavzeveii* (World Health Organization, 2022).

*Candida albicans* a levedura do gênero *Candida* mais estudada devido às suas múltiplas características como fungo comensal e patógeno oportunista pertence ao clado *Lodderomyces* (Kidd; Abdolrasouli; Hagen, 2023), é uma espécie polimórfica, apresentando morfologias diversificadas, capaz de formar pseudohifas e hifas verdadeiras, a espécie tem a habilidade de sair da forma leveduriforme para a filamentosa, e voltar novamente a blastoconídeo (Min; Park, 2025). Sendo relatada na literatura como a causa mais comum de candidemia sistêmica com risco de vida, a *C. albicans* surgiu nas últimas décadas como grave problema de saúde pública, com infecções profundas em pacientes hospitalizados,

apresentando altas taxas de morbidade e mortalidade (Pappas *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2023; Parambath *et al.*, 2024).

*Candida tropicalis* é uma das espécies mais intimamente relacionadas a *C. albicans*, onde fazem parte do mesmo clado, *Lodderomyces* (Kidd; Abdolrasouli; Hagen, 2023). Descrita na literatura como forte produtora de biofilme, com fatores de virulência, como alta produção de adesinas, que promovem melhor adesão a células epiteliais e endoteliais bucais. Apresenta polimorfismo, formando pseudohifas e com alguns relatos de formação de hifas verdadeiras, apresenta um fenômeno chamado troca fenotípica, o *White-Opaque switching*, que são mudanças morfológicas e de coloração nas colônias, promovendo o aumento da virulência. Essas características a classificam como uma das espécies mais patogênicas oportunista relacionadas a infecções fúngicas no trato urinário de pacientes imunocomprometidos, como diabéticos, podendo evoluir para infecções sistêmicas (Song *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2022; Shiyadeh *et al.*, 2024; Carpenter, 2025; Souza *et al.*, 2025).

*Candida parapsilosis* ou complexo de *Candida parapsilosis*, como também é conhecida, pertence ao clado *Lodderomyces*, sofreu mudanças recentes, sendo subdividida em três espécies: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis* e *C. metapsilosis* (Takashima; Sugita, 2022). É uma espécie que apresenta dimorfismo, sendo formadora de pseudohifas, produz proteinase, lipases e fosfolipases, assim como a formação do biofilme, a sua virulência em comparação a *C. albicans*, é bem baixa, mas é uma das mais prevalentes em ambiente hospitalar (Arastehfar *et al.*, 2020; Branco; Miranda; Rodrigues, 2023). *C. parapsilosis* possui uma alta afinidade em colonizar células de recém-nascidos prematuros de baixo peso, sendo um dos principais agentes causadores de infecções invasivas e de mortalidade neonatal (Cook *et al.*, 2023; Ferreras-Antolin, Chowdhary; Warris, 2025).

*Nakaseomyces glabrata*, a *C. glabrata*, pertence ao clado *Nakaseomyces*, que apresenta resistência intrínseca aos compostos azólicos (Stavrou, 2019). *N. glabrata* não apresenta dimorfismo, sendo a forma leveduriforme (blastocóndio), sua forma patogênica, mas apresenta muitos fatores de virulência característicos do gênero *Candida*, como a produção de proteases, fosfolipases e hemolisinas, mas há uma hipervirulência devido ao aumento de fatores de adesão e modificações em enzimas de invasão, e seus biofilmes, consistem em uma monocamada compacta ou multicamada que não forma filamentos (Hernando-Ortiz *et al.*, 2020; Frías-de-León *et al.*, 2021; Hassan *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2024). Apesar de não formar estruturas filamentosas, a *N. glabrata* é um patógeno oportunista capaz de causar infecções sistêmicas graves, com alta taxa de mortalidade e complicações na

terapia antifúngica devido a resistência intrínseca aos antifúngicos de primeira linha de tratamento (Duggan; Usher, 2023; Beardsley *et al.*, 2024; Katsipoulaki *et al.*, 2024).

*Pichia kudriavzevii*, ou como é conhecida na clínica *C. krusei*, do clado *Pichia*, apresenta resistência intrínseca aos compostos azólicos (Stavrou, 2019), é uma das espécies de *Candida* dimórficas, sendo formadora de pseudohifas, com produção de enzimas proteases, fosfolipases e adesinas, e boa formadora de biofilme (Khalifa *et al.*, 2022; Kountchou *et al.*, 2023). Relatada como uma espécie com as menores taxas de sobrevivência, com taxas de mortalidade de 67% em adultos com comorbidades graves ou imunossuprimidos (Ricardo *et al.*, 2020; Khalifa *et al.*, 2022; Nguyen *et al.*, 2024). As candidemias causadas por *P. kudriavzevii* são fortemente relatadas em pacientes HIV positivo, o que eleva a preocupação com a gravidade das infecções e as dificuldades de terapia antifúngica devido à resistência antifúngica da espécie (Gómez-Gaviria; Ramírez-Sotelo; Mora-Montes, 2022; Kountchou *et al.*, 2023; Jain *et al.*, 2025).

*Candidozyma auris*, a *Candida auris*, que pertence ao clado *Metschnikovia*, foi relatada pela primeira vez em 2009, quando foi isolada do canal auditivo de uma paciente em um hospital no Japão, apresentando multirresistência antifúngica intrínseca, sendo essa espécie pertencente ao clado *Metschnikovia* (Satoh *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2024; Abe *et al.*, 2025). No Brasil foi relatada pela primeira vez em 2020 em um hospital no estado da Bahia, o paciente estava internado na Unidade de Terapia Intensiva (UTI), acometido com síndrome respiratória grave, resultante da COVID-19 (Almeida Jr *et al.*, 2021). Apresentando características bem distintas das outras espécies de *Candida*, como a termotolerância, crescendo em temperaturas entre 37-42 °C. Sendo nas últimas décadas um importante patógeno associado a surtos nosocomiais no mundo, é capaz de colonizar a pele, aumentando a transmissão e causando surtos de candidemia invasiva. As infecções invasivas causadas por *C. auris* em UTIs podem chegar a índices de mortalidade de até 80% (Grassie; Karabiçak; Altintop, 2025; Rathod *et al.*, 2025). *C. auris* apresenta mecanismos de virulência bem parecidos com a *C. albicans*, sendo capaz de formar pseudohifas, sendo uma espécie dimórfica (Chow *et al.*, 2020; Fan *et al.*, 2021; Garcia-Bustos *et al.*, 2021; Kim; Cha; Bahn, 2024; Bing *et al.*, 2024).

### 3.2. *Candida albicans*

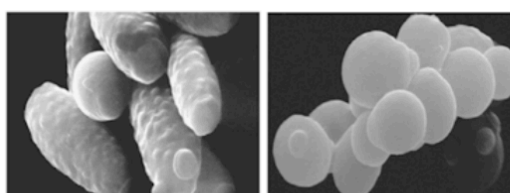
O polimorfismo de *C. albicans* é a característica que a distingue de outras *Candida* spp., com exceção da *C. dublibleneses* que também é polimórfica e com capacidade de formar

tubo germinativo, mas que não é prevalente em infecções invasivas ou sistêmicas. A alta virulência de *C. albicans* está relacionada ao seu polimorfismo, sendo esse um fator chave para causar infecções, marcando a mudança da forma comensal (leveduriforme) para a patogênica (filamentosa) (Lash *et al.*, 2023; Böttcher *et al.*, 2024; Wakade; Wellington; Krysan, 2024).



**Figura 1.** Imagem adaptada de Sudbery (2004), morfologias de *C. albicans*, a. blastoconídios, b. hifas com tubos germinativos e c. pseudohifas.

A espécie ainda apresenta variabilidade fenotípica, o *switching*, que é a capacidade de mudar a aparência das colônias entre lisas, ásperas a enrugadas, e de aumentar a circunferência, e ainda as suas colorações, o *White-Opaque switching*, mudando de brancas ovaladas para a cor opaca com morfologia alongada e com projeções laterais semelhantes a espinhos. Essas mudanças são reversíveis, normalmente são associadas ao comensalismo, adaptações para sobrevivência e reprodução (Park *et al.*, 2020; Cui *et al.*, 2024; Soll, 2024). As transições morfológicas e a reversão entre os estados de branco e opaco das células, são hereditárias e cada tipo de célula levará diferentes propriedades de acasalamento, nutrição, morfologia celular, entre outros. As mudanças morfológicas e fenotípicas ocorrem em respostas a estímulos externos como pH, temperatura, carência de nutrientes etc (Brenes *et al.*, 2020).



**Figura 2.** Imagem adaptada de Park (2004), da mudança de branco-opaco (*White-Opaque switching*) de *C. albicans*.

*C. albicans* coloniza a mucosa oral, vaginal e gastrointestinal de indivíduos saudáveis como um comensal inofensivo, mas por ser oportunista, se aproveita dos desequilíbrios na imunidade dos hospedeiros para iniciar focos infecciosos (Rodriguez *et al.*, 2020). A colonização infecciosa acontece devido aos muitos fatores de virulência que a espécie possui, que são fatores independentes, mas que atuam em paralelo. As adesinas são enzimas que têm como função promover a adesão nas células e/ou a outros substratos. As adesinas de *C. albicans* são expressas pelas proteínas *Als* (da família de sequências semelhantes à aglutinina) e *Hwp1* (proteína da parede hifal 1) que é relacionada exclusivamente à formação de hifas verdadeiras. Onde a adesão é o primeiro ponto de ação para instalar a infecção (He *et al.*, 2021; Martorano-Fernandes *et al.*, 2023; Soriano-Abarca *et al.*, 2024).

A mudança de morfologia atua na invasão as células hospedeiras, onde as pseudohifas e hifas verdadeiras penetram as células do hospedeiro, e ao penetrar, o biofilme começa a ser maturado, e a forma filamentosa também atua na estruturação do biofilme (Lapaquette *et al.*, 2022; Garbe *et al.*, 2023; Baxter *et al.*, 2024). *C. albicans* quando em contato com soro sanguíneo forma estruturas chamadas tubos germinativos, que surgem nas extremidades de hifas verdadeiras jovens, essas estruturas aumentam a capacidade de invadir as células do hospedeiro por isso a *C. albicans* é uma das espécies mais virulentas do gênero *Candida* (Jung *et al.*, 2020; Gutzmann *et al.*, 2024). A produção de enzimas hidrolíticas, as proteinases (Saps), fosfolipases, lipases (LIPs) e hemolisinas, que possuem muitas funções. As proteases degradam as proteínas das células hospedeiras, facilitam a invasão e ajudam na adesão. As fosfolipases hidrolisam os fosfolipídios da membrana celular hospedeira facilitando a invasão e atuam na evasão imunológica. As lipases hidrolisam os triglicerídeos das células hospedeiras e auxiliam na sobrevivência da célula fúngica em ambientes com poucos nutrientes. E as hemolisinas, degradam as hemácias, assim liberam o ferro da hemoglobina para utilizar como nutrientes para a célula fúngica. Elas atuam em paralelo desde os primeiros estágios da infecção, auxiliando na adesão e no processo de invasão para que o biofilme seja formado (Mccall, 2019; Fathi; Mahmoudabadi; Fatahinia, 2022; Mashaly; Zeid, 2022).

O biofilme além de ser um fator de virulência, é uma das razões para os longos tratamentos antifúngicos. Eles dificultam a ação dos antifúngicos por serem células que estão protegidas do estresse externo, uma vez que são envolvidos por uma matriz extracelular secretada pelas próprias células e que possuem suas próprias características de desviar do sistema de defesa do hospedeiro e da ação dos fármacos durante o tratamento antifúngico. Como consequência, pode levar a resistência antifúngica, sendo assim também um mecanismo de resistência antifúngico (Mccall, 2019; Mashaly; Zeid, 2022).

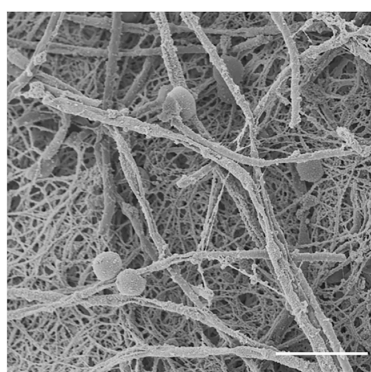
As infecções sistêmicas com risco de vida por *C. albicans* surgem quando o fungo migra para outras áreas anatômicas do hospedeiro, onde não são naturais a sua colonização, como quando entram na corrente sanguínea. E uma vez no sangue, *C. albicans* pode se disseminar para quase todos os órgãos, como rins, fígado e baço, causando infecções genitourinárias, gastrointestinais e nasofaríngeas (Pappas *et al.*, 2018; Fidel; Yano; Esher, 2020; Lopes; Lionakis, 2022; Lass-Flörl *et al.*, 2024). Os índices de mortalidade associados a infecções invasivas causadas por *C. albicans* em ambiente hospitalar varia de 20-50%, sendo maior em pacientes críticos e imunossuprimidos. Com morbidade causada por complicações clínicas relatadas na faixa de até 10% de endocardite em adultos e crianças com mais de 10 anos. E em neonatos com índices de até 50% (Parambath *et al.*, 2024). A taxa de mortalidade de infecções invasivas causadas por *Candida* spp. em pacientes em UTI durante a pandemia de COVID-19 foi de 80,2%, com a *C. albicans* sendo a mais isolada dos pacientes, sendo 49,1% dos casos. A maioria dos casos de mortalidade foi em pacientes idosos que já apresentavam comorbidades (Karadağ *et al.*, 2025).

### 3.3. Biofilme

O biofilme de modo geral é uma forma de crescimento microbiano, onde as células de microrganismos são envolvidas por uma matriz extracelular polissacarídica secretadas pelas próprias células. As células de biofilme ficam protegidas das ações externas, sejam elas físicas ou biológicas, além de serem estruturas especializadas que possuem métodos de comunicação entre as células. O biofilme é fator de grande importância para a patogenicidade de microrganismos, podendo ser formado com células de uma mesma espécie como também, de outras espécies. Os biofilmes podem se formar em estruturas sólidas e interfaces líquidas no ambiente, nas células de mamíferos e em dispositivos hospitalares, dentaduras e próteses (Muhammad *et al.*, 2020; Mishra *et al.*, 2022; Sionov; Steinberg, 2022; Balducci *et al.*, 2023).

Para a formação dos biofilmes, muitos processos e eventos moleculares são acionados para cada uma de suas etapas, mas de forma sucinta, a formação do biofilme de *C. albicans* se inicia com adesão a algum substrato, biótico ou abiótico. Para que adesão ocorra, enzimas chamadas adesinas (*Als* da família de sequências semelhantes à aglutinina e *Hwp1*, a proteína da parede hifal 1), são produzidas para que as células leveduriformes possam se ligar ao substrato alvo formando assim uma camada basal. Em seguida, as células começam a mudar de morfologia, como pseudohifas e hifas, sendo a forma filamentosa o que irá proporcionar a invasão as células do hospedeiro assim como, dar a sustentação e forma ao biofilme, sendo

esse, o segundo estágio da formação. As células usam biosinalizadores para se comunicarem, essa comunicação é chamada de *quorum sensing*. Os biosinalizadores são o tirosol e o farnesol, onde o tirosol estimula a formação de hifas e maturação do biofilme. Já o farnesol atua na inibição hifal e maturação do biofilme, sendo ele o sinal para dispersar as células planctônicas do biofilme para reiniciar o processo em outros locais. As células então começam a terceira parte do processo, a maturação das células, nesse momento começam a secretar polímeros extracelulares ao redor, ricos em carboidratos e proteínas, expandindo a área de proteção celular, formando uma estrutura tridimensional robusta. Em contrapartida, as células dentro do biofilme apresentam crescimento menor. E para finalizar, as células irão começar a dispersão de novas células planctônicas, morfologia de blastoconídios, para que possam migrar para iniciar novos pontos de infecção. As células que são liberadas apresentam mais virulência que as células que iniciaram o processo (Mccall, 2019; Sachivkina *et al.*, 2020; Honorato *et al.*, 2022; Mourer *et al.*, 2023; Irianto *et al.*, 2025).



**Figura 3.** Imagem adaptada de Mitchell (2016), de microscopia eletrônica de varredura de um biofilme de *C. albicans* cultivado em um cateter venoso central de rato.

A candidemia sistêmica causada por *C. albicans* é uma das principais razões para a morte em infecções fúngicas nosocomiais e oportunistas em pacientes no mundo, e isso se deve a capacidade de formar biofilme, que diminui a suscetibilidade das células fúngicas aos antifúngicos (Kaur; Nobile, 2023; Kovács *et al.*, 2024; Parambath *et al.*, 2024). Os biofilmes de *Candida* spp., especialmente com atividade metabólica intermediária/alta, estão relacionados à maior mortalidade na candidemia, com taxas de mortalidade significativamente em torno de 61% (Vitális *et al.*, 2020). Durante um processo infeccioso as células de defesa do sistema imunológico reconhecem os componentes da parede celular fúngica e migram até o local da infecção, mas quando chegam ao local e encontram o biofilme, não conseguem

penetrar a membrana extracelular (Eix; Nett, 2020; Ponde *et al.*, 2021; Smolarz *et al.*, 2021). Há relatos na literatura da capacidade das células de biofilme de *C. albicans* incorporarem células e proteínas dos hospedeiros em biofilmes clínicos, incluindo células de defesa (Eix; Nett, 2020; Smolarz *et al.*, 2021).

O biofilme apresenta três mecanismos principais próprios de resistência antifúngica, a presença da matriz extracelular, que impede os antifúngicos de se ligarem aos seus sítios de ação nas células fúngicas. A regulação positiva das bombas de efluxo já nas primeiras horas de adesão mesmo na ausência de antifúngicos. E células persistentes, que muitas vezes foram expostas por longos períodos aos fármacos e se adaptaram a eles (Kaur; Nobile, 2023; Massey; Zarnowski; Andes, 2023; Roy; Gow, 2023).

### 3.4. Citotoxicidade e resistência antifúngica

A *C. albicans* é sensível intrinsecamente às quatro classes de antifúngicos, contudo, devido a questões multifatoriais, relatos de resistência antifúngica estão mais frequentes e um dos fatores que contribuem para esse evento é o biofilme (Mashaly; Zeid, 2022; Kaur; Nobile, 2023; Parambath *et al.*, 2024). Para o tratamento das infecções fúngicas invasivas ou sistêmicas causadas por *Candida* spp., as candidemias, há escolhas de primeira linha para o tratamento baseadas no grau da infecção, ação dos antifúngicos e na citotoxicidade apresentada nas células humanas. As classes mais usadas para tratamento são, os triazóis (Fluconazol, Itraconazol, Voriconazol, Posaconazol, Isavuconazol), equinocandinas (Caspofungina, Anidulafungina e Micafungina) e polienos (Anfotericina B) (Johnson, 2021; Noppè *et al.*, 2024; Cornely *et al.*, 2025).

Os antifúngicos possuem alvos distintos de ação nas células fúngicas, onde os compostos azólicos, por exemplo, atuam na biossíntese do ergosterol, especificamente na enzima lanosterol 14- $\alpha$ -desmetilase, que atua na conversão de lanosterol para ergosterol. Uma vez que impedem a conversão, a membrana plásmática fica fraca já que não houve o coplamento do ergosterol (Villasmil *et al.*, 2020; Wall; Lopez-Ribot, 2020). Os polienos possuem ação se ligando ao ergosterol, um dos principais esteróis presente na membrana plasmática, quando ocorre a ligação, são criados poros na membrana que irão causar o extravasamento do conteúdo intracelular das células fúngicas e conseqüentemente a morte (Wall; Lopez-Ribot, 2020; Ngece *et al.*, 2024). As equinocandinas são na  $\beta$ -1,3-glucana sintase, que sintetiza os glucanos que compõem a parede celular, após a ligação nas glucanas, as equinocandinas inibem a produção de glucanas, tornando a parede celular fraca e ocasionando

na lise celular (Wall; Lopez-Ribot, 2020; Szymański *et al.*, 2023). E os análogos da pirimidina, nas enzimas que atuam na síntese dos ácidos nucleicos, ao se ligarem nas enzimas da via da pirimidina, a sintetização dos ácidos nucleicos é comprometida levando a morte das células fúngicas (Wall; Lopez-Ribot, 2020; Sigerá; Denning, 2023).

Quanto à citotoxicidade, os compostos azólicos de modo geral são hepatotóxicos, mas as formulações mais recentes, os triazóis, apresentam citotoxicidade mais baixas. Por atuar na CYP51 do citocromo P450 dos fungos, os azólicos em afinidade com as CYPs do citocromo P450 do organismo humano, levando o acúmulo intracelular dos fármacos e gerando toxicidade metabólica (Teixeira *et al.*, 2022; Zhou *et al.*, 2022). A Anfotericina B é o antifúngico mais citotóxico apresentando nefrotoxicidade, causando lesão renal aguda e acidose tubular com perda de eletrólitos na maioria dos pacientes. Devido a sua ação ser por ligações no ergosterol das células fúngicas, a Anfotericina B acaba se ligando ao colesterol das células humanas no geral, mas principalmente aos das células do túbulo renal, levando a perda de integridade da membrana da mesma forma que nas células fúngicas, criando poros. As formulações lipossomais são mais seguras para uso na terapia, reduzindo muito os índices de nefrotoxicidade (Caputo *et al.*, 2020; Akinosoglou *et al.*, 2024). As equinocandinas são a classe que apresentam menores taxas de citotoxicidade, sendo considerado eventos adversos raros, uma vez que atuam na parede celular fúngica e são ausentes nas células humanas. Há relatos de eventos adversos cardíacos, como arritmias e insuficiência cardíaca, em alguns pacientes tratados com Caspofungina e com exceção da Anidulafungina, os demais são metabolizados pelo fígado e podem causar grau leve hepatotoxicidade (Mroczyńska *et al.*, 2020; Badkoubeh *et al.*, 2022). Da classe dos análogos da pirimidina, para que a 5-Flucitosina fique ativa precisa ser metabolizada e com isso sua citotoxicidade depende da metabolização e da concentração usada no paciente, e quando ocorre, resulta em supressão da medula óssea e hepatite (Delma *et al.*, 2021; Sigerá; Denning, 2023). Todos os fármacos antifúngicos podem causar alguma citotoxicidade hepática, variando de efeitos leves e assintomáticas na função hepática a lesões hepáticas substanciais, e insuficiência hepática fulminante a depender da dose e condições de saúde e clínicas dos pacientes (Zhou *et al.*, 2022).

Em relação a resistência antifúngica, os principais mecanismos de resistência antifúngica apresentados por *C. albicans* também ocorrem em outras espécies de *Candida*. Em compostos azólicos são por modificações no gene *ERG11*, que mudam a conformação da enzima causando uma ligação fraca do azol ou, o aumento da expressão da enzima e o fármaco não consegue inibir, e a superexpressão de bomba de efluxo após exposição aos medicamentos. As bombas de efluxo podem ser codificadas com multi atuações de genes, mas

os genes que são mais associados as ativações são os *CDR1* e *MDR1*, que ativam os transportadores da família ABC (*ATP-binding cassette*) e da superfamília MFS (*major facilitator superfamily*), respectivamente (Lee; Robbins; Cowen, 2023; Ceballos-Garzon *et al.*, 2023). A resistência aos polienos é rara, mas quando ocorre são por mutações nos genes *ERG*, sendo mais frequente no *ERG11* e *ERG3*, ocasionando em substituições do ergosterol por outros esteróis na membrana plasmática, impossibilitando a ligação do fármaco a seu alvo ou levando a ligação sem ação (Carolus *et al.*, 2020; Lee; Robbins; Cowen, 2023). Para as equinocandinas, são no gene *FKS1*, mais precisamente nos “hotspots” *HS1* e *HS2* desse gene, mudando a conformação da glucana sintase na parede celular impedindo a ação dessa classe de antifúngicos (Coste *et al.*, 2020; Lee; Robbins; Cowen, 2023). E aos análogos da pirimidina, são nos genes *FCY2*, *FCY1* e *FUR1*, impedindo a entrada da 5-flucitosina (5-FC) de entrar na célula fúngica, não converte a 5-FC em 5-FU e impede que o 5-FU de ser metabolizado pela célula fúngica, respectivamente, evitando assim a inibição da síntese de DNA e RNA (Lee; Robbins; Cowen, 2023; Sigera; Denning, 2023). Esses mecanismos de resistência adquiridos pelas células planctônicas podem ser compartilhados para as células de biofilme (Kaur; Nobile, 2023).

Quanto a terapia antibiofilme, já foi embasado a dificuldade de terapia devido os mecanismos de proteção que culminam em resistência antifúngicos dos biofilmes. Mas diante das opções antifúngicas, os compostos azólicos não são ideais uma vez que a ativação de bombas de efluxo já se inicia nas horas iniciais do processo de formação do biofilme (Kaur; Nobile, 2023). Os polienos podem ser usados para tratar biofilmes, mas são necessárias concentrações mais altas de Anfotericina B. E há os polienos lipossomais que são encapsulados que apresentam melhores resultados contra biofilmes de *C. albicans* que os polienos convencionais (Ajetunmobi *et al.*, 2023; Akinosoglou *et al.*, 2024). A classe mais indicada são equinocandinas, onde os antifúngicos dessa classe conseguem penetrar a matriz extracelular de forma parcial e iniciar sua ação contra as células fúngicas que alcançaram. Por ter ação nas  $\beta$ -glucanas da parede celular, as equinocandinas podem reduzir as  $\beta$ -glucanas presente na matriz excelular do biofilme comprometendo a integridade do biofilme e levando a evação pelas células de defesa do corpo (Nett; Andes, 2020; Karkowska-Kuleta *et al.*, 2023; Roy; Gow, 2023).

### 3.5. Produtos naturais

As poucas opções terapêuticas, o aumento da resistência antifúngica, e a problemática da citotoxicidade dos antifúngicos, promovem pesquisas com produtos naturais que apresentem atividade antifúngica e sejam seguros para ajudar no tratamento de infecções fúngicas. Os produtos naturais são bioativos obtidos na natureza de muitas fontes, mas em maioria são advindos de plantas medicinais. As plantas medicinais são usadas na medicina popular há milhares de anos para tratar enfermidades, apresentando amplo espectro de atividade biológica (Kyaw *et al.*, 2021; Souza *et al.*, 2021; Evbuomwan; Adeyemi; Oluba, 2023). O conhecido tradicional e uso de plantas medicinais seguem até os dias atuais nas comunidades quilombolas, com uma variedade de plantas cultivadas e usadas para tratar gripe, inflamações no geral e para rituais, sendo assim a continuação da cultura e do conhecimento dos povos originários (Valeriano *et al.*, 2020).

O uso de plantas medicinais como terapia ao longo da história contribuiu para que o conhecimento popular fosse reconhecido cientificamente, onde nos dias atuais já são implementadas alternativas terapêuticas e remédios formulados à base de plantas medicinais (Sagy *et al.*, 2019; Shan *et al.*, 2020; Talib *et al.*, 2020; Csikós *et al.*, 2021). No Sistema Único de Saúde (SUS), são disponibilizadas plantas medicinais e fitoterápicos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), para a população de modo geral, com o objetivo de preservar o conhecimento medicinal tradicional, garantindo sua segurança (Ministério da Saúde, 2025).

Pelos meses de 2026 o Brasil terá o primeiro fitoterápico industrializado oriundo da planta *Phyllanthus niruri*, popularmente conhecida como quebra-pedra, conhecida por seus usos tradicionais para tratar problemas nos rins. Essa conquista advém da parceria do Programa das Nações Unidas para o Desenvolvimento (PNUD), a Fiocruz (Fundação Oswaldo Cruz) que possui um instituto de desenvolvimento de fármacos, o Instituto de Tecnologia em Fármacos (Farmanguinhos/Fiocruz) e com órgãos do governo federal, para que o fitoterápico seja disponibilizado no SUS (Fiocruz, 2025).

Os compostos bioativos das plantas medicinais são produzidos pela via do metabolismo secundário, onde os constituintes químicos não são essenciais para o desenvolvimento das plantas, mas atuam como mecanismo de proteção contra a herbivoria. A composição química sofre variação entre as espécies, anatomia vegetal e estágio de desenvolvimento das plantas, assim como depende das condições ambientais. Mas na

literatura, é descrito que, principalmente, são fenólicos, terpenos, taninos e flavonoides (Li *et al.*, 2020; Chiocchio *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023).

Os bioativos de plantas medicinais são adquiridos de formas diversas e resultam em produtos distintos que podem ser usados para muitas finalidades. Podem ser por cozimento para preparação de chás, maceração, extração e purificação, dependendo se a técnica é artesanal ou com uso de equipamentos apropriados e com técnicas industriais (Abubakar; Haque, 2020). Podem ser produtos isolados para uso clínico e em procedimentos médicos, como a morfina (Najmi *et al.*, 2022), e ainda em fase experimental, mas com resultados promissores em tratamento de doenças degenerativas, como os canabinoides (Hakami; Alshehri, 2025). Extratos formulados para fins fitoterápicos e suplementos alimentares, extratos antioxidantes dermocosméticos, e óleos essenciais com diversos usos na indústria farmacêutica, alimentar e cosmética (Kyriakoudi *et al.*, 2021; Masyita *et al.*, 2022; Abdelmaksoud *et al.*, 2025). Dentro do potencial biológico dos bioativos de plantas medicinais está o antimicrobiano (AlSheikh *et al.*, 2020).

### 3.6. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são produtos secundários produzidos em geral por plantas aromáticas, onde são constituídos de compostos químicos voláteis e fotossensíveis distintos (Sousa *et al.*, 2023). A literatura cita que em maioria são benzenoides, fenilpropanoides, monoterpênicos e sesquiterpênicos que apresentam atividades biológicas variadas, dentre elas, propriedades medicinais (Sadgrove; Padilla-González; Phumthum, 2022; Sousa *et al.*, 2023).

É citado que o uso popular de óleos essenciais é desde o Egito e Mesopotâmia antigos, com usos medicinais, desinfecções e em rituais religiosos. Na culinária como aromatizantes de comidas e vinhos e usos cosméticos, para fazer perfumes, óleos corporais e na prática de mumificação (Ivanova *et al.*, 2025). Em outras regiões e etnias também eram usados para fins cosméticos e alimentares, de forma medicinal, na Grécia em Roma com uso de tônicos e analgésicos (Cimino *et al.*, 2021). Na Ásia em práticas espirituais e equilíbrio energético para tratar enfermidades (Vora *et al.*, 2024). E na idade média no uso contra pragas e epidemias (Udourioh *et al.*, 2025).

A quantidade de constituintes na composição dos óleos essenciais é influenciada por condições do local onde a planta se encontra, genótipo da espécie, estágio de desenvolvimento, parte anatômica, período do dia, período do ano e afins. Somado a esses

fatores, a composição também irá depender do método utilizado para a extração do OE, dependendo do método escolhido a constituição química poderá ser alterada (Abifarín; Otunola; Afolayan, 2020; Haro-González *et al.*, 2021; Salleh *et al.*, 2022).

O conhecimento e uso popular dos OEs tornaram possível seus usos como agentes terapêuticos alternativos para muitas doenças, sendo descritos com ação ansiolítica e antidepressiva, são usados para aliviar estresse, distúrbios do sono, ansiedade e depressão (Zhang *et al.*, 2018; Okano *et al.*, 2019). Apresentam efeitos potenciais em doenças degenerativas e comprometimento cognitivo como, Alzheimer e Mal de Parkinson (Hung *et al.*, 2022; Muhammad *et al.*, 2023). Com atividades relatadas na literatura de ação antioxidantes, anti-inflamatórias, antitumorais, antilavídicida, antibacterianas, antifúngicas e antivirais (Pavela *et al.*, 2019; Ling *et al.*, 2022; Sneha *et al.*, 2022; Pereira *et al.*, 2023; Zimmermann *et al.*, 2023).

Pesquisas da atividade antimicrobiana de óleos essenciais de espécies e gêneros botânicos diferentes são relatadas na literatura com testes contra bactérias Gram-Positivas e Gram-Negativas e contra fungos. Como exemplo, o *Origanum vulgare* que apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (Tejada-Muñoz *et al.*, 2024). *Syzygium aromaticum* com atividade contra *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à oxacilina (Freitas *et al.*, 2025) e contra *C. albicans*, com inibição da formação do biofilme (Rifai *et al.*, 2024). *Lavandula angustifolia* contra *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *S. aureus* e *Bacillus subtilis* e antifúngica contra *C. albicans* (Stamova *et al.*, 2025). E *Cinnamomum verum* contra espécies de *Candida* na forma planctônica e de biofilme, e também com ação sobre o polimorfismo de *C. albicans* (Wijesinghe *et al.*, 2020).

### 3.7. Gênero *Citrus*

O gênero *Citrus* pertence à família Rutaceae, que compreende cerca de 140 gêneros e 1300 espécies no mundo. A origem de *Citrus* spp. ainda é incerta, mas acredita-se que sejam originais do sudeste da Ásia. E seu cultivo em outras regiões do mundo é teorizado que se deu pelo comércio durante o período das rotas comerciais das Grandes Navegações. As plantas de *Citrus* são usadas na medicina popular há milhares de anos pelas suas ricas propriedades alimentícias e medicinais, e isso contribuiu para seu cultivo em diversas culturas do mundo (Zhong; Nicolosi, 2020; Appelhans *et al.*, 2021; Johnson *et al.*, 2025).

Fontes ricas em vitamina C, o ácido ascórbico, que é um forte agente antioxidante e que atua no fortalecimento do sistema imunológico (Dosedě *et al.*, 2021). Em flavonoides, que possuem ações antioxidantes e anti-inflamatórias (Al-Khayri *et al.*, 2022), limonoides, com ação antioxidantes e antimicrobiana, e fibra alimentar, dentre outros, tem como característica marcante o cheiro forte e agradável (Saini *et al.*, 2022). São usados muito na medicina tradicional no preparo de chá das cascas, folhas e flores, para tratar problemas gastrodigestivos, como calmantes e para resfriados (Pasdaran *et al.*, 2023).

*Citrus* spp. também são conhecidos por serem fontes ricas em óleos essenciais, com composição química constituída de terpenos, maioria monoterpenos seguidos por sesquiterpenos, compostos oxigenados e aromáticos (González-Mas *et al.*, 2019; Saini *et al.*, 2022). São usados na perfumaria, cosméticos e alimentar (Sharmeen *et al.*, 2021; Bora *et al.*, 2020), assim como são usados na aromaterapia (Caballero-Gallardo; Quintero-Rincón; Olivero-Verbel, 2025; Moradi *et al.*, 2025). Dentre os muitos constituintes dos OEs de *Citrus* spp. o relatado na literatura como majoritário é o limoneno, composto da classe dos monoterpenos, contudo, a sua quantidade varia de acordo de onde foi extraído, estando mais abundante em óleos essenciais extraídos das cascas (González-Mas *et al.*, 2019; Saini *et al.*, 2022).

A hibridização das espécies é o que torna o gênero *Citrus* tão vasto. De acordo com as pesquisas sobre a evolução das espécies, acredita-se que as espécies atuais de *Citrus* foram originadas do cruzamento de *C. medica*, *C. maxima* e *C. reticulata*, a cidra, o pomelo e a tangerina, respectivamente, e cruzamentos das mesmas entre as híbridas (Wang *et al.*, 2022). As espécies híbridas mais conhecidas são a *C. sinensis*, a laranja doce, *C. aurantium*, laranja azeda, *C. aurantifolia*, lima ácida, *C. limon*, limão siciliano e a *C. paradisi*, a toranja. Todas as espécies híbridas sofreram processos complexos de cruzamentos até os dias atuais, mas baseado na derivação ancestral foram identificados os cruzamentos listados na tabela 1.

**Tabela 1.** Cruzamentos entre espécies de *Citrus*.

Espécies	Cruzamento	Referência
<i>C. aurantium</i>	<i>C. reticulata</i> x <i>C. maxima</i>	Guerra <i>et al.</i> , 2020
<i>C. sinensis</i>	<i>C. reticulata</i> x <i>C. maxima</i>	Seminara <i>et al.</i> , 2023
<i>C. aurantifolia</i>	<i>C. medica</i> x <i>C. micrantha</i>	Massaro; Thomson; Leichty, 2025

<i>C. limon</i>	<i>C. medica</i> x <i>C. aurantium</i>	Klimek-Szczykutowicz; Szopa; Ekiert, 2020
<i>C. paradisi</i>	<i>C. maxima</i> x <i>C. sinensis</i>	Pardo <i>et al.</i> , 2023

### 3.8. *Citrus limon* (L.) Burm. f. e *Citrus sinensis* (L.) Osbeck

*C. limon*, o limoeiro ou limão siciliano, apresenta fruto de cor amarelada e de aspecto rugoso, com flores brancas, as folhas são de formato ovalado a elíptico, tamanho médio e com pecíolo curto e pouco alado, com textura fina e flexível (Figura 4) (Klimek-Szczykutowicz; Szopa; Ekiert, 2020). O OE de *C. limon* pode ser obtido através da extração das cascas dos frutos ou das folhas, podendo apresentar variação da quantidade dos compostos que formam a constituição química, mas mantendo o limoneno como o mais abundante. É relatado na literatura com inúmeras propriedades biológicas, dentre elas, as atividades antibacterianas e antifúngicas (Petretto *et al.*, 2023; Kačániová *et al.*, 2024).



**Figura 4.** Foto das folhas de *Citrus limon*. Fonte: Própria autora, 2025.

*C. limon* apresenta atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, e antifúngica, contra fungos filamentosos e leveduriformes tanto de OEs extraídos de cascas quanto das folhas. Os valores das Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) estão na tabela 2.

**Tabela 2.** Atividade antimicrobiana de *C. limon* extraído de cascas e folhas.

<i>C. limon</i>	Microrganismos	CIMs	Referências
Folhas	<i>S. aureus</i> (+) 6538	6,4 mg/mL	Wu <i>et al.</i> , 2021

	<i>S. aureus</i> (+) 29213	3,2 mg/mL	
	<i>S. epidermidis</i> (+)	6,4 mg/mL	
	<i>S. typhimurium</i> (-)	>12,8 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	>12,8 mg/mL	
Folhas	<i>C. albicans</i> 3933	0,625 mg/mL	Petretto <i>et al.</i> ,
	<i>C. albicans</i> 3993	0,625 mg/mL	2023
	<i>S. aureus</i> (+) 20231	2,5 mg/mL	
	<i>S. aureus</i> (+) 2569	2,5 mg/mL	
	<i>S. aureus</i> (+) 6148	2,5 mg/mL	
	<i>L. monocytogenes</i> (+) 20600	2,5 mg/mL	
	<i>L. monocytogenes</i> (+) 15675	5 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-) 30083	10 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-) 4415	20 mg/mL	
	<i>S. bongori</i> (-) 13772	>20 mg/mL	
Folhas	<i>A. flavus</i> (Fungo filamentoso)	4,00 mg/mL	Riaz <i>et al.</i> , 2023
	<i>R. solani</i> (Fungo filamentoso)	2,50 mg/mL	
	<i>A. alternata</i> (Fungo filamentoso)	3,00 mg/mL	
	<i>B. subtilis</i> (+)	3,50 mg/mL	
	<i>S. aureus</i> (+)	2,50 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	2,05 mg/mL	
Cascas	<i>S. aureus</i> (+) 6538	3,2 mg/mL	Wu <i>et al.</i> , 2021
	<i>S. aureus</i> (+) 29213	1,6 mg/mL	
	<i>S. epidermidis</i> (+)	1,6 mg/mL	
	<i>S. typhimurium</i> (-)	3,2 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	3,2 mg/mL	
Cascas	<i>C. albicans</i>	24,03 mg/mL	Kačániová <i>et al.</i> ,
	<i>C. glabrata</i>	3,48 mg/mL	2024
	<i>C. krusei</i>	12,28 mg/mL	
	<i>C. tropicalis</i>	6,41 mg/mL	
	<i>B. cereus</i> (+)	3,62 mg/mL	
	<i>M. luteus</i> (+)	2,52 mg/mL	
	<i>S. aureus</i> (+)	6,37 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	22,8 mg/mL	
	<i>V. parahaemolyticus</i> (-)	6,35 mg/mL	
	<i>Y. enterocolitica</i> (-)	12,58 mg/mL	
Cascas	<i>C. albicans</i>	1,7 mg/mL	Kodad <i>et al.</i> ,
	<i>S. aureus</i> (+)	6,6 mg/mL	2025
	<i>B. subtilis</i> (+)	13,3 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	13,3 mg/mL	
	<i>P. aeruginosa</i> (-)	6,6 mg/mL	
	<i>K. pneumoniae</i> (-)	13,3 mg/mL	

*C. sinensis*, a laranjeira ou laranja doce, possui frutos de cor alaranjada, as flores são brancas e com folhas ovaladas a oblongas, mais largas, com pecíolo alado, apresenta textura espessa e coriácea (Figura 5) (Dongre *et al.*, 2023). A extração do OECS é semelhante ao do OECL, pode ser feita das cascas ou das folhas, com a probabilidade de variação da quantidade da constituição química, mas com o limoneno sendo o mais abundante. E dentre as atividades

relatadas na literatura, também há as antibacterianas e antifúngicas (Anwar *et al.* 2023; Hamdan *et al.*, 2024).



**Figura 5.** Foto das folhas de *Citrus sinensis*. Fonte: Própria autora, 2025.

Na tabela 3 estão os resultados das CIMs de óleos de *C. sinensis* extraídos de folhas e cascas. Apresentando atividade antibacteriana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas, e antifúngica, contra fungos filamentosos e leveduriformes.

**Tabela 3.** Atividade antimicrobiana de *C. sinensis* extraído de cascas e folhas.

<i>C. sinensis</i>	Microrganismos	CIMs	Referências
Folhas	<i>C. albicans</i>	100 mg/mL	Hamdan <i>et al.</i> , 2024
	<i>S. aureus</i> (+)	25 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	66,7 mg/mL	
	<i>P. aeruginosa</i> (-)	100 mg/mL	
	<i>K. pneumoniae</i> (-)	66,7 mg/mL	
	<i>P. vulgaris</i> (-)	66,7 mg/mL	
Cascas	<i>A. niger</i> (Fungo filamentoso)	1 µg/mL	Sado <i>et al.</i> , 2022
	<i>A. versicolor</i> (Fungo filamentoso)	0,5 µg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	0,5 µg/mL	
	<i>S. aureus</i> (+)	0,25 µg/mL	
Cascas	<i>A. alternata</i> (Fungo filamentoso)	2,5 mg/mL	Anwar <i>et al.</i> , 2023
	<i>A. flavus</i> (Fungo filamentoso)	8,33 mg/mL	
	<i>A. niger</i> (Fungo filamentoso)	6,67 mg/mL	
	<i>E. coli</i> (-)	13,02 mg/mL	
	<i>S. aureus</i> (+)	10,41 mg/mL	
	<i>S. agalactiae</i> (+)	6,51 mg/mL	

---

Cascas	<i>C. albicans</i>	15 µl/mL	Yakubu; Katsa,
	<i>A. niger</i> (Fungo filamentoso)	18 µl/mL	2025
	<i>S. aureus</i> (+)	20 µl/mL	
	<i>P. aeruginosa</i> (-)	18 µl/mL	
	<i>S. typhi</i> (-)	16 µl/mL	

---

## 4 OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo geral

Analisar a constituição química e atividade antifúngica dos óleos essenciais das folhas de *Citrus limon* e *Citrus sinensis* contra *Candida albicans* na forma planctônica e de biofilme. Assim como o potencial citotóxico contra eritrócitos humanos e perfil farmacocinético utilizando abordagens *in silico*.

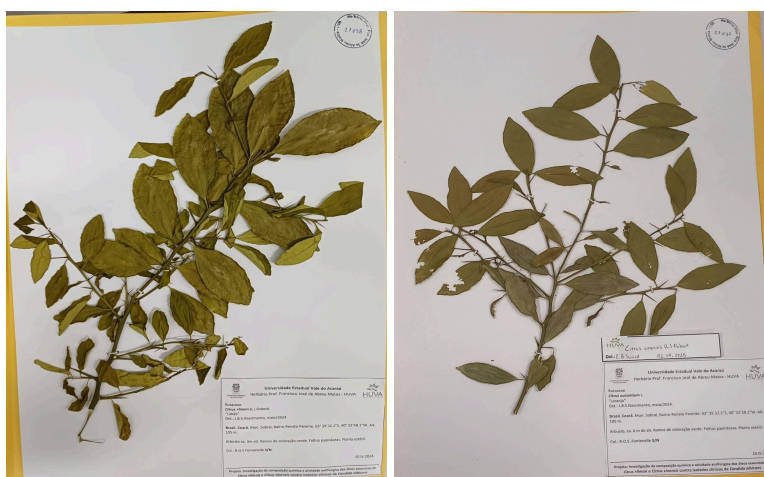
### 4.2. Objetivos específicos

- Identificar os componentes presentes nos óleos essenciais das folhas de *Citrus limon* e *Citrus sinensis*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis* contra cepas de *C. albicans*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do composto majoritário dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis*, o Limoneno, contra cepas de *C. albicans*;
- Avaliar a cinética do tempo de morte dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis* e dos antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol contra cepas de *C. albicans*;
- Avaliar o efeito modulatório dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis* combinados com os antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol, e combinados entre si contra cepas de *C. albicans*;
- Avaliar a atividade antibiofilme de *C. limon* e *C. sinensis* sobre a adesão e sobre o biofilme maduro de *C. albicans*;
- Avaliar o efeito dos óleos de *Citrus* sobre a morfologia de *C. albicans* na adesão e sobre o biofilme maduro;
- Verificar o potencial citotóxico de *C. limon* e *C. sinensis* contra eritrócitos humanos;
- Realizar predições farmacocinéticas usando abordagens *in silico*.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. Coleta botânica

As folhas de *C. limon* e *C. sinensis* foram coletadas pela manhã, em uma propriedade na cidade de Sobral-CE (3°39'32.1"S, 40°22'58.1"W), durante a estação chuvosa, em março de 2023. As folhas foram imediatamente retiradas para extração e uma amostra foi enviada ao Herbário Professor Francisco José de Abreu Matos (HUVA) da Universidade Estadual do Vale do Acaraú, onde foi autenticada e um espécime de suporte foi depositado (HUVA nº 27038 de *Citrus limon* e HUVA nº 27037 de *Citrus sinensis*).



**Figura 6.** Exsicatas das plantas *C. limon* e *C. sinensis* depositadas no Herbário Prof. Francisco José de Abreu Matos - HUVA.

### 5.2. Extração dos óleos essenciais

A extração foi realizada no Laboratório de Análises Orgânicas e Atividades de Produtos Naturais da UVA, onde ocorreu por meio do processo de hidrodestilação em aparelho dosador tipo Clevenger, onde as folhas foram picadas, sendo 405 g de *C. limon* e 349 g de folhas de *C. sinensis*, depois as massas secas foram colocadas em um balão de fundo redondo de 2000 mL. O balão foi colocado na manta de aquecimento com água aquecida a 100 °C dentro e fora, com temperatura de 100 °C, conectado a um sistema de resfriamento por 2 h para cada espécie. Após a extração, os óleos essenciais foram secos sobre Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro (~1 g), filtrados e armazenados em frasco hermeticamente fechado a 4 °C. O rendimento foi determinado pela razão entre a quantidade final de óleo essencial

obtida e a massa de folhas frescas utilizadas na extração:  $R = [v(\text{mL})/m(\text{g})] * 100$ . A densidade foi determinada pelo cálculo:  $D = m(\text{g})/v(\text{mL})$ .



**Figura 7.** Processo de extração dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis*.

### 5.3. Análise dos componentes químicos dos óleos essenciais

As análises dos constituintes químicos dos OEs foram realizadas por CG-EM no Laboratório Multiusuário de Química de Produtos Naturais da Embrapa Agroindústria Tropical - Fortaleza. A CG-EM foi realizada em um instrumento Agilent modelo GC-7890B/MSD-5977A (quadrupolo), com impacto de elétrons a 70 eV, coluna HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, Agilent), gás carreador hélio com fluxo de 1,00 mL.min<sup>-1</sup>, temperatura do injetor 250 °C, temperatura do detector 150 °C e fonte de íons 230 °C, temperatura da linha de transferência 280 °C. Programação do forno cromatográfico: temperatura inicial de 70 °C, com rampa de aquecimento de 4 °C.min<sup>-1</sup> até 180 °C e acréscimo de 10 °C/min até 250 °C ao término da corrida (34,5 min). A identificação dos compostos foi realizada pela análise dos padrões de fragmentação exibidos nos espectros de massas com aqueles presentes na base de dados fornecida pelo equipamento (NIST versão 2.0 de 2012 – 243.893 compostos) e de dados da literatura (Adams, 2017).

### 5.4. Cepas de *Candida albicans*

Foram utilizadas as cepas de *Candida albicans* do Laboratório de Microbiologia da UVA - LABMIC, sendo a ATCC 90028 obtida da *American Type Culture Collection*, LABMIC 0102 (hemocultura), LABMIC 0104 (cepa de aspirado traqueal) e LABMIC 0105

(hemocultura), provenientes da Santa Casa de Misericórdia de Sobral (Ceará, Brasil). E as cepas LABMIC 0134, LABMIC 0135 e LABMIC 0136 (cepas isoladas da cavidade oral de pacientes HIV +), provenientes da Micoteca da UNILAB - Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (Ceará, Brasil). Todas as cepas foram previamente identificadas por sistema Vitek 2 (BioMérieux Vitek, Hazelwood, França) e por meio cromogênico, utilizando o meio CHROMagar-*Candida* (BD Diagnostics, Heidelberg, Alemanha).

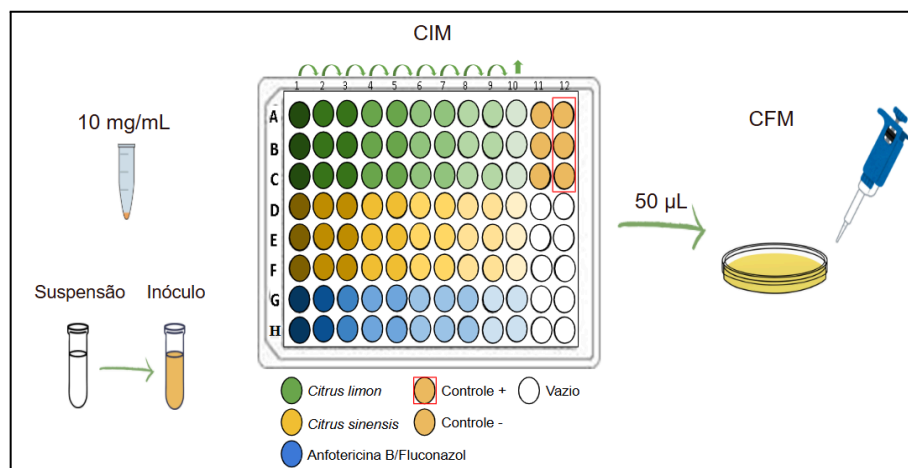
## 5.5. Método de microdiluição em caldo

### 5.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O teste de microdiluição em caldo foi realizado de acordo com a norma M27-A3 do CLSI (CLSI, 2008). As cepas de *C. albicans* foram cultivadas em tubos de Ágar Sabouraud Dextrose (SDA) e incubadas por 24 h a 37 °C. O inóculo foi preparado utilizando a escala McFarland 0.5 ( $10^6$  UFC/ml), seguido de uma diluição em RPMI de 1:2000 ( $2 \times 10^2$  UFC/mL). Os óleos essenciais foram diluídos em uma concentração de 10 mg/mL com RPMI e DMSO a 5%. Em placas de 96 poços de fundo U, foram distribuídos 100 µL de RPMI em todos os poços. Em seguida, 100 µL dos OEs e o composto majoritário, o R-(+)-Limoneno (Sigma-Aldrich), foram adicionados na primeira coluna e realizadas diluições seriadas no intervalo de concentração de 10-0,004 mg/mL. Foram utilizados a Anfotericina B (Sigma-Aldrich) como controle no intervalo de concentrações de 16-0,25 µg/mL e o Fluconazol (Medley) em 64-0,5 µg/mL. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C. A concentração inibitória mínima (CIM) foi a menor concentração onde não foi observado crescimento visual na placa. O experimento foi realizado em triplicata.

### 5.5.2. Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)

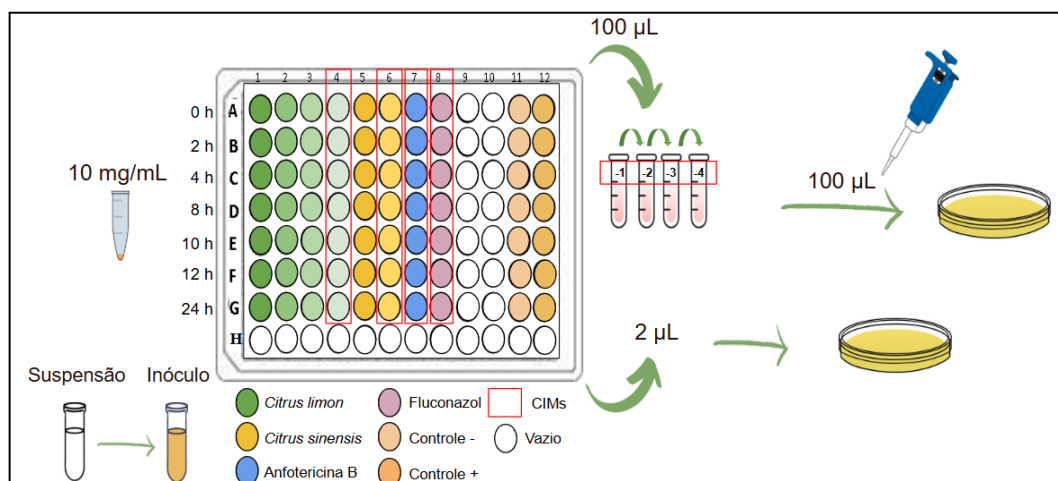
Para determinar o CFM dos compostos, foram retiradas alíquotas de 50 µL do meio presente nas cavidades da placa de 96 poços que não apresentaram crescimento fúngico e semeadas em placas de petri com meio de cultivo Sabouraud dextrose agar (SDA). As placas foram incubadas a 37°C por 24 h (Fontenelle *et al.*, 2007).



**Figura 8.** Desenho esquemático da metodologia de Microdiluição em Caldo para determinar a Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima dos óleos essenciais de *Citrus* e do Limoneno frente a cepas de *C. albicans*.

### 5.6. Cinética do tempo de morte

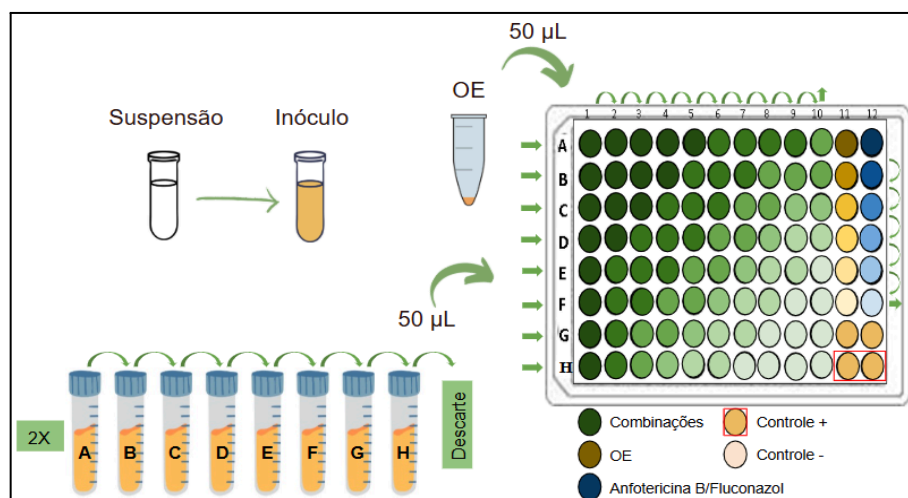
Em placas de 96 poços foram adicionadas as suspensões da cepa ATCC 90028 diluídas em meio RPMI-1640 com MOPS a 2%, que foram preparadas utilizando a escala McFarland 0.5 ( $10^6$  UFC/mL). Em seguida, foram adicionados os tratamentos de cada composto nas concentrações inibitórias. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h e as alíquotas de 100 µL foram removidas nos tempos predeterminados de 0, 4, 8, 10, 12 e 24 h. As alíquotas foram diluídas em série (quatro vezes) em solução salina e semeadas em placas contendo meio Sabouraud dextrose agar (SDA). Os números de colônias foram contados após a incubação das placas a 37 °C por 24 h. Paralelamente ao tempo de morte, foram retiradas alíquotas de 2 µL de cada um dos tratamentos e adicionadas na superfície de placas com SDA e, após as alíquotas secas, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (Kwolek-Mirek; Zadrag-Tecza, 2014). A contagem de UFC/mL foi calculada como a média de duas réplicas, e os resultados foram apresentados em  $\log_{10}$  UFC/mL. O valor de UFC/mL foi calculado multiplicando-se o número de colônias pelo inverso da diluição e pelo fator de diluição de 10.



**Figura 9.** Desenho esquemático da metodologia de Cinética do Tempo de Morte dos óleos essenciais de *Citrus*, Anfotericina B e Fluconazol frente a cepa ATCC 90028 de *C. albicans*.

### 5.7. Checkerboard

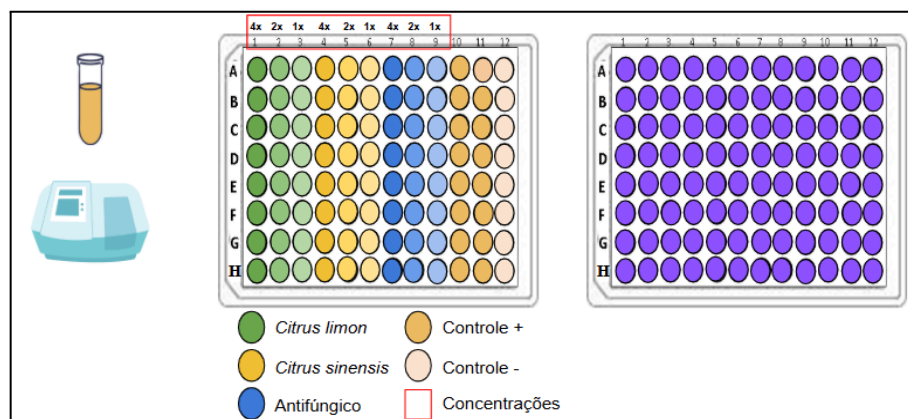
O efeito modulatório dos compostos com o antifúngico comercial foi determinado utilizando a técnica de *Checkerboard*. Essa técnica é definida através do cálculo do Índice de Concentração Inibitória Fracionária (ICIF), que avalia a interação com a droga de uso padrão. O ICIF é obtido somando as Concentrações Inibitórias Fracionárias (CIF) de cada composto testado. A CIF é definida como a razão entre a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do composto em combinação e a CIM do mesmo composto isolada. Para os ensaios, foi utilizada a cepa ATCC 90028, onde a turbidez das suspensões fúngicas foi preparada utilizando a escala McFarland 0.5 ( $10^6$  UFC/ml). Os compostos testados foram usados nas concentrações determinadas a partir de suas respectivas CIMs e foram feitas combinações dos óleos essenciais com Anfotericina B e Fluconazol, assim como dos óleos essenciais combinados entre si. Inicialmente, 50  $\mu$ L do meio RPMI foram adicionados em todos os 96 poços da placa de microdiluição. Em seguida, foram adicionados na primeira coluna 50  $\mu$ L dos óleos essenciais e feitas diluições seriadas a partir dessa concentração até a coluna 10. Nas linhas de A a H foram colocados 50  $\mu$ L dos antifúngicos comerciais, Anfotericina B e Fluconazol, nas diferentes concentrações, que foram diluídos seriadamente em tubos falcons. Por último, foram adicionados 100  $\mu$ L do inóculo em todos os poços. Foram feitos controles das CIMs de cada composto, além do controle negativo contendo apenas o meio e o controle positivo de crescimento, com meio e inóculo. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 h (Johnson *et al.*, 2004).



**Figura 10.** Desenho esquemático da metodologia de *Checkerboard* com a combinação dos óleos essenciais de *Citrus* com Anfotericina B e Fluconazol e, entre si, frente a cepa ATCC 90028 de *C. albicans*.

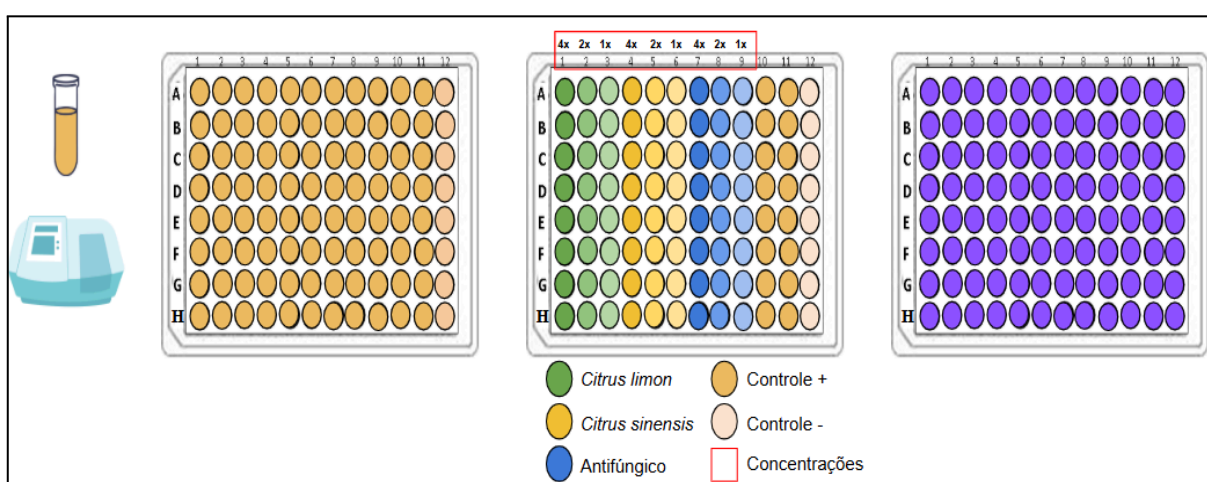
### 5.8. Ensaio de inibição do biofilme

Os ensaios para determinar o efeito dos compostos sobre a adesão do biofilme foram avaliados pela quantificação da biomassa por cristal violeta. Para os ensaios, foi utilizada a cepa ATCC 90028, onde o inóculo foi suspenso em RPMI 1640 com 2% de glucose e a concentração foi ajustada em um espectrofotômetro para  $2 \times 10^6$  células  $\text{ml}^{-1}$ . Foram adicionados 100  $\mu\text{L}$  da suspensão fúngica na placa de poliestireno de fundo chato. Após adicionar o inóculo, foram adicionados os tratamentos de cada composto nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM. Foram feitos controles de formação do biofilme. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 200  $\mu\text{L}$  de solução salina para remoção das células planctônicas. O biofilme foi fixado com 200  $\mu\text{L}$  de metanol (99%) por 10 min, após esse período, foi removido dos poços e esperou-se a secagem. Logo após a secagem, foram adicionados aos poços 200  $\mu\text{L}$  de cristal violeta a 1% (M/V) por 10 min para corar as células. Em seguida, foi lavado três vezes com água destilada estéril. Após a secagem da placa, foram adicionados aos poços 200  $\mu\text{L}$  de ácido acético 33% (V/V) por 10 min para dissolver o corante presente nas células aderidas. Foram transferidos 150  $\mu\text{L}$  para uma nova placa e a leitura foi feita no espectrofotômetro a 590 nm. A % de inibição do biofilme foi definida:  $\% = 100 - (\text{OD da amostra tratada} / \text{OD do controle positivo não tratado}) \times 100$  (Pierce *et al.*, 2008).



**Figura 11.** Desenho esquemático da metodologia de quantificação total da biomassa da adesão do biofilme da cepa ATCC 90028 de *C. albicans* tratada com os óleos essenciais de *Citrus*, Anfotericina B e Fluconazol.

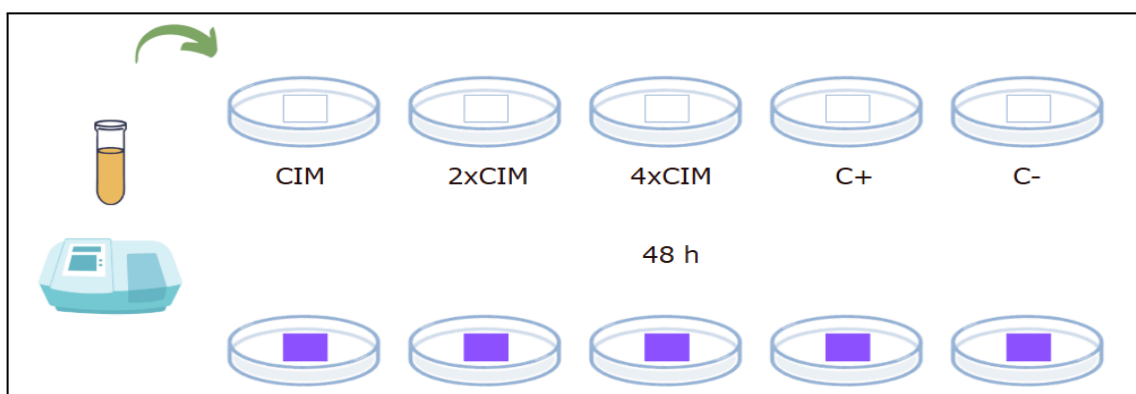
Para a erradicação do biofilme maduro, foram adicionados 200  $\mu$ L da suspensão fúngica nos poços da placa de poliestireno e incubada por 48 h a 37  $^{\circ}$ C. Após o período de incubação, os poços foram lavados três vezes com 200  $\mu$ L de solução salina para remoção das células planctônicas, depois foram adicionados os tratamentos de cada composto nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM. Em seguida, a placa foi incubada novamente por 24 h a 37  $^{\circ}$ C. Posteriormente, a placa foi lavada três vezes com 200  $\mu$ L de solução salina e foi realizado o mesmo processo como descrito anteriormente para a leitura no espectrofotômetro a 590 nm.



**Figura 12.** Desenho esquemático da metodologia de quantificação total da biomassa do biofilme maduro da cepa ATCC 90028 de *C. albicans* tratada com os óleos essenciais de *Citrus*, Anfotericina B e Fluconazol.

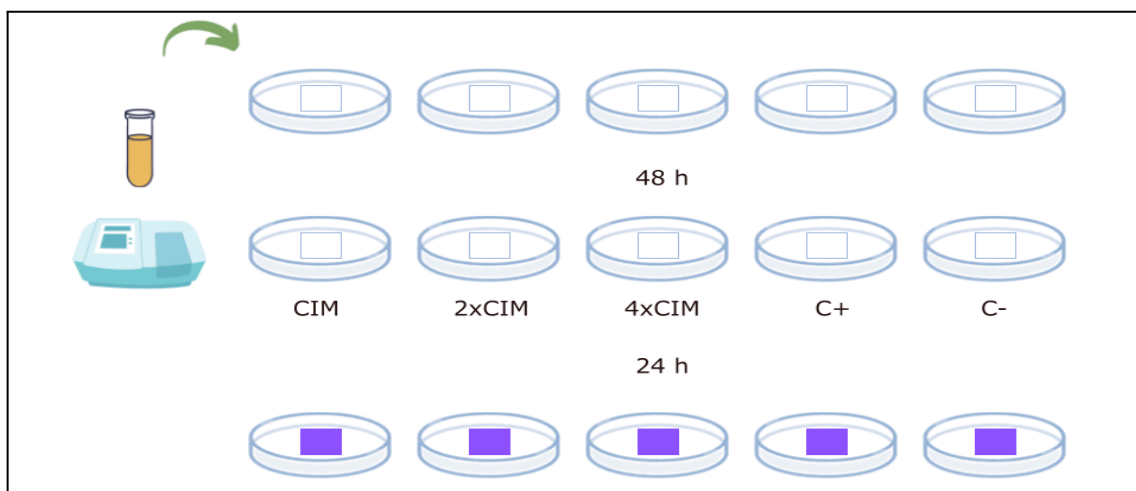
### 5.9. Efeito dos óleos de *Citrus* sobre a morfologia de *Candida albicans*

A capacidade dos óleos essenciais de inibir a formação de biofilme e o seu efeito sobre a morfologia de *C. albicans* foram observados por microscopia óptica de luz. Para isso, culturas da cepa ATCC 90028 foram colocadas sobre lamínulas e realizados os mesmos tratamentos descritos no ensaio de inibição da adesão do biofilme em placas de 96 poços. As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 5 mL de solução salina para remoção das células planctônicas. O biofilme foi fixado com 5 mL de metanol (99%) por 10 min, após esse período, foi removido dos poços e esperado a secagem. Logo após a secagem, as lamínulas foram transferidas para novas placas de petri e coradas com cristal violeta a 1% (M/V) por 10 min para corar as células, depois foram lavadas três vezes com água destilada e esperadas secar. Após a secagem, as lamínulas foram visualizadas em microscópio óptico de luz invertida em 400x (Fu *et al.*, 2021).



**Figura 13.** Desenho esquemático da metodologia dos efeitos dos óleos essenciais de *Citrus* sobre a morfologia de *C. albicans*, na adesão da cepa ATCC 90028.

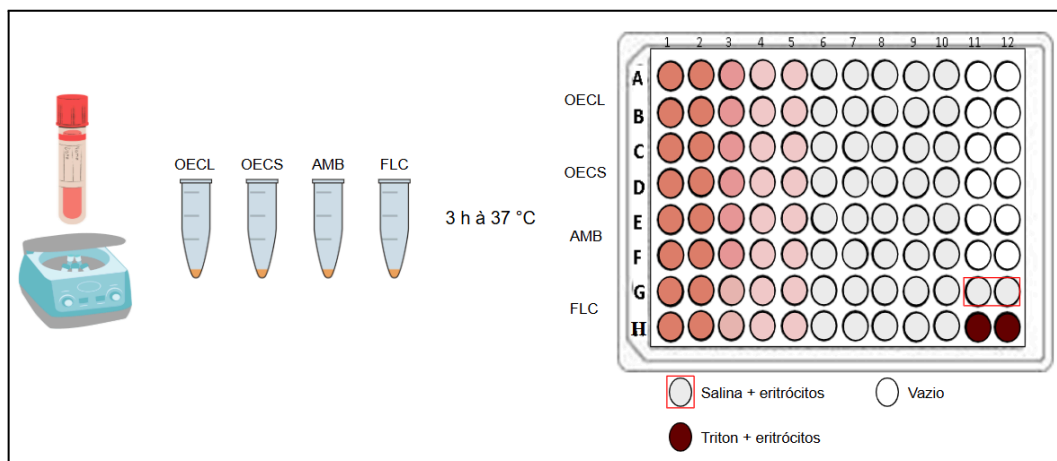
Para a microscopia da erradicação do biofilme maduro, as culturas de *C. albicans* foram colocadas sobre lamínulas e as placas foram incubadas por 48 h a 37 °C. Após o período de incubação, as placas foram lavadas três vezes com 5 mL de solução salina para remoção das células planctônicas e foram adicionados os tratamentos, como descrito nos ensaios de biofilme maduro. As placas foram novamente incubadas a 37 °C por 24 h. As placas foram lavadas três vezes com 5 mL de solução salina após o período de incubação e foi realizado o mesmo processo como descrito anteriormente para a visualização das lamínulas.



**Figura 14.** Desenho esquemático da metodologia do efeito dos óleos essenciais de *Citrus* sobre a morfologia de *C. albicans*, biofilme maduro da cepa ATCC 90028.

### 5.10. 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 microcentrífuga, contendo 100 µL de cada composto diluídos seriadamente, com concentrações variando de 20-0,039 mg/mL para os OEs, 250-30 µg/mL para Anfotericina B e 7.500-3.000 µg/mL para Fluconazol. As concentrações finais da suspensão de eritrócitos foram de 4% (v/v). Estas suspensões foram homogeneizadas em vortex e incubadas 3 h a 37 °C. Após o tempo de incubação, os sobrenadantes foram transferidos para uma placa de microdiluição de 96 poços, e a liberação de hemoglobina foi medida por absorbância a 540 nm. Foram utilizados Triton X-100 a 1% com 4% (v/v) de RBCs, e PBS com 4% (v/v) de RBCs 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).



**Figura 15.** Desenho esquemático da metodologia de atividade hemolítica dos óleos essenciais de *Citrus*, Anfotericina B e Fluconazol sobre eritrócitos.

### 5.11. Análise estatística

Os dados do ensaio de biofilme foram submetidos à análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey, utilizando o GraphPad Prism versão 8.0. A citotoxicidade foi avaliada pelo cálculo dos valores de  $CL_{50}$ . Inicialmente, foi realizada a transformação logarítmica e a subsequente normalização dos dados em porcentagem, onde a densidade óptica do controle negativo (células não tratadas) foi considerada como 100% de viabilidade e o Triton X-100 como 100% de mortalidade. Os valores de  $CL_{50}$  obtidos após o tratamento das células com óleos essenciais foram calculados utilizando uma curva de regressão não linear com o programa GraphPad Prism, com um intervalo de confiança de 95%.

### 5.12. Farmacocinética

Os compostos presentes na constituição química dos óleos essenciais (OEs) de *Citrus* foram obtidos no banco de dados PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), no formato SMILES canônico (limoneno CID: 22311;  $\beta$ -pineno CID: 14896; citronelal CID: 7794; eucaliptol CID: 2758; sabineno CID: 18818). Para a predição farmacocinética *in silico*, foram utilizados dois softwares. As propriedades de absorção, distribuição, metabolismo e excreção (ADMET) foram previstas por meio do software pkCSM (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) (Hajlaoui *et al.*, 2021). Adicionalmente, o software SwissADME (<http://www.swissadme.ch/>) foi empregado para gerar o gráfico

*BOILED-Egg*, que ilustra a capacidade dos compostos de interagir com a glicoproteína P (P-gp), atravessar a barreira hematoencefálica e gastrointestinal, além de fornecer parâmetros relacionados à lipofilicidade e polaridade (Rauf *et al.*, 2023).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Óleos essenciais

O óleo essencial de *C. limon* apresentou um rendimento de 0,49% (v/g) e uma densidade de 0,874 g/mL. Já o óleo essencial de *C. sinensis* apresentou um rendimento de 0,51% e uma densidade de 0,795 g/mL. Quanto às características visuais dos óleos essenciais, ambos eram lípidos e ligeiramente amarelados, sendo o de *C. limon* com um aroma forte característico da espécie e o de *C. sinensis* com um aroma mais suave. Na análise dos componentes químicos dos óleos essenciais, o limoneno foi identificado como o composto majoritário em ambos os óleos, com 40,81% para *C. limon* e 36,69% para *C. sinensis* (Tabela 4). Os constituintes  $\beta$ -pineno, citronelal, eucaliptol e sabineno também estão presentes em quantidades maiores em ambos os óleos essenciais, com variações (Tabela 4). A literatura descreve que os óleos essenciais de *Citrus* têm composições químicas ricas em limoneno, mas também existem óleos essenciais onde os principais compostos com as maiores porcentagens são o 2- $\beta$ -pineno e o  $\delta$ -3-careno (Nidhi *et al.*, 2020; Ambrosio *et al.*, 2021).

**Tabela 4.** Composição química dos óleos essenciais das folhas de *C. limon* e *C. sinensis*.

Compostos	<i>Citrus limon</i>			<i>Citrus sinensis</i>		
	<sup>1</sup> IR <sub>calc</sub>	<sup>2</sup> IR <sub>lit</sub>	Área (%)	<sup>1</sup> IR <sub>calc</sub>	<sup>2</sup> IR <sub>lit</sub>	Área (%)
$\alpha$ -Pinene	936	932	1,65	936	932	1,28
Sabinene	976	969	7,1	975	969	5,85
$\beta$ -Pinene	981	974	16,49	981	974	14,61
Myrcene	992	988	1,12	992	988	0,71
<i>o</i> -Cymene	-	-	-	1026	1022	0,73
<b>Limonene</b>	1030	1024	<b>40,81</b>	1030	1024	<b>36,69</b>
Eucalyptol	1033	1026	7,83	1033	1026	10,48
delta-2-Carene	-	-	-	1102	1001	1,15
cis-Limonene oxide	-	-	-	1135	1132	2,74
cis- $\beta$ -Ocimene	1036	1032	0,53	-	-	-
trans- $\beta$ -Ocimene	1046	1044	1,82	-	-	-
Limonene epoxide	-	-	-	1139	1137	1,36
Citronellal	1153	1148	12,29	1153	1148	8,88
Terpinen-4-ol	1180	1174	0,51	1180	1174	0,54
$\alpha$ -Terpineol	1193	1186	2,2	1193	1186	2,57
Myrtenol	-	-	-	1199	1194	0,5
Citronellol	1229	1223	0,6	1229	1223	0,53
Neral	1242	1235	2,27	-	-	-
Geranial	1272	1264	2,57	1272	1264	1,35
cis-Pinocarvyl acetate	-	-	-	1309	1311	1,37
Myrtenyl acetate	-	-	-	1324	1324	0,72
Citronellyl acetate	1354	1350	0,62	1354	1350	1,11

$\beta$ -Caryophyllene	1421	1417	0,79	-	-	-
Caryophyllene oxide	-	-	-	1584	1582	0,8
<b>Composição Total</b>	99,20			93,97		

<sup>1</sup>Valores de IR calculado.

<sup>2</sup>Valores de IR da literatura (Adams, 2017).

## 6.2. Microdiluição em caldo

Os óleos essenciais demonstraram atividade antifúngica contra todas as cepas testadas (Tabela 5), sendo que *C. limon* apresentou uma CIM variando de 0,625 a 0,312 mg/mL e uma CFM de 1,25 a 0,312 mg/mL. *C. sinensis* apresentou uma CIM variando de 1,25 a 0,625 mg/mL e uma CFM de 1,25 mg/mL para as cepas testadas. O limoneno, por sua vez, apresentou uma CIM entre 2,5 e 1,25 mg/mL e uma CFM de 2,5 mg/mL. Os resultados dos testes de controle com os antifúngicos Anfotericina B e Fluconazol foram CIM e CFM de 0,5  $\mu$ g/mL para todas as cepas testadas com Anfotericina B, e para o Fluconazol, CIM variando de 1 a 2  $\mu$ g/mL e CFM entre 4 e 8  $\mu$ g/mL. Os resultados do limoneno demonstram que, apesar de ser o principal composto dos óleos essenciais, ele isoladamente apresenta menor atividade antifúngica do que os próprios óleos essenciais. Isso pode ser explicado pelo fato de que o desempenho geral dos óleos essenciais é frequentemente atribuído a interações sinérgicas ou aditivas entre seus constituintes primários e secundários (Fokas; Giormezis; Vantarakis, 2025).

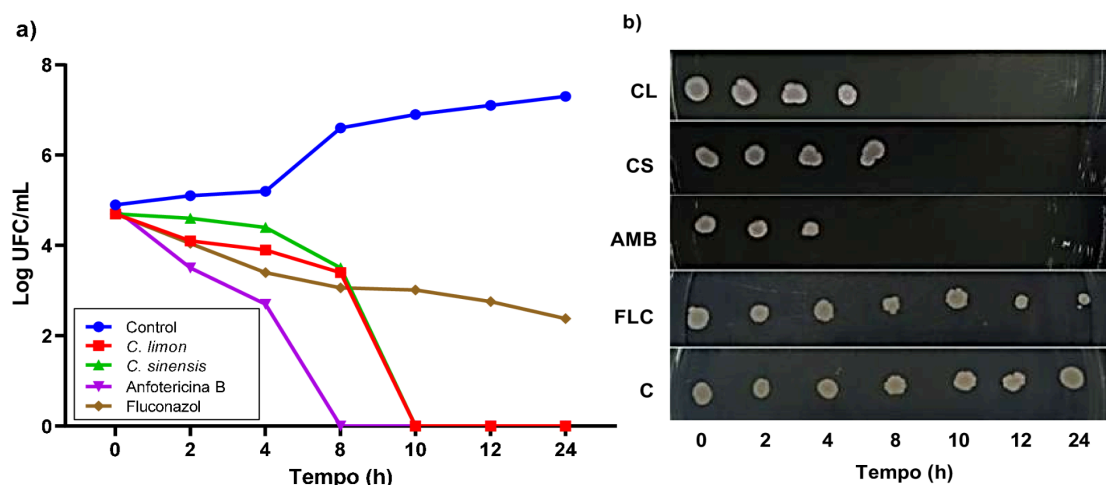
**Tabela 5.** Resultado da atividade dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis*, e do composto majoritário, limoneno, e das drogas padrões, a Anfotericina B e Fluconazol contra cepas de *C. albicans*.

CEPAS	<i>C. limon</i>		<i>C. sinensis</i>		Limoneno		Anfotericina B		Fluconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 90028	0,312	0,625	1,25	1,25	2,5	2,5	0,5	0,5	1	4
LABMIC 0102	0,312	0,625	0,625	1,25	2,5	2,5	0,5	0,5	2	8
LABMIC 0104	0,312	0,312	0,625	1,25	2,5	2,5	0,5	0,5	1	4
LABMIC 0105	0,625	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	0,5	0,5	1	4
LABMIC 0134	0,625	1,25	1,25	1,25	1,25	2,5	0,5	0,5	1	8
LABMIC 0135	0,625	1,25	1,25	1,25	2,5	2,5	0,5	0,5	1	4

LABMIC 0136 0,625 0,625 0,625 1,25 2,5 2,5 0,5 0,5 1 4  
 CIM e CFM para OEs e Limoneno mg/mL. E para AMB e FLC  $\mu\text{g/mL}$ .

### 6.3. Cinética do tempo de morte

Os óleos essenciais apresentaram cinética de morte celular semelhante, com 100% das células tratadas eliminadas após 10 horas (Figura 16a). Após 8 horas de tratamento, *C. limon* e *C. sinensis* reduziram 27,65% e 25,6% das células, respectivamente. A Anfotericina B reduziu 43,75% das células após 4 horas e, após 8 horas de tratamento, eliminou 100% das células. O Fluconazol reduziu 34,04% das células após 8 horas e, após 24 horas, eliminou 48,94% delas (Figura 16a). Na análise da morfologia das células tratadas, observou-se que as colônias dos tratamentos com *C. limon* e Anfotericina B diminuíram de tamanho até cessarem completamente o crescimento. *C. sinensis* não apresentou alterações na redução do tamanho das colônias, mas também não apresentou crescimento adicional após 10 horas. O Fluconazol reduziu o tamanho da colônia, mas apresentou crescimento após 24 h (Figura 16b). Os resultados dos óleos essenciais mostraram um efeito fungicida muito semelhante ao da Anfotericina B, eliminando 100% das células após 10 h de tratamento, enquanto a Anfotericina B apresentou esse efeito após 8 h de tratamento. Thakre *et al.* (2018) testaram o efeito do limoneno em *C. albicans* nas formas planctônica e de biofilme. O limoneno induziu danos à parede celular e à membrana celular, levando ao estresse oxidativo e causando danos ao DNA, além de induzir apoptose em *C. albicans*.



**Figura 16. a)** Curvas de morte das células fúngicas (Concentrações Inibitórias Mínimas) dos óleos essenciais das folhas de *C. limon* (CL) e *C. sinensis* (CS) e dos antifúngicos Anfotericina B (AMB) e Fluconazol (FLC) contra

*C. albicans* ATCC 90028. **b)** Formação de colônias de *C. albicans* em meio SDA após tratamento com óleos essenciais, AMB e FLC por até 24 h.

#### **6.4. Checkerboard**

As combinações de óleos essenciais com Anfotericina B apresentaram resultados indiferentes (Tabela 6), ou seja, a combinação dos compostos não resultou em modulação. No entanto, as combinações com Fluconazol mostraram um efeito sinérgico para a combinação com *C. sinensis* e um efeito aditivo para a combinação com *C. limon* (Tabela 6). Na combinação de óleos essenciais, o resultado foi indiferente (Tabela 6). Os efeitos sinérgicos obtidos na combinação de *C. sinensis* com Fluconazol e a aditivo de *C. limon* com fluconazol são promissores, uma vez que conseguiram reduzir a CIM de ambos os compostos para a cepa testada. Isso demonstra que ambos os óleos essenciais poderiam ser usados como terapia alternativa em combinação com Fluconazol, reduzindo assim a dose do antifúngico convencional durante o tratamento do paciente. O Fluconazol, um agente antifúngico da classe dos azóis, é um dos tratamentos de primeira linha para infecções fúngicas. No entanto, seu uso prolongado está relacionado ao aumento da resistência antifúngica adquirida em *C. albicans* (Lu *et al.*, 2021; Sobel, 2023). O Fluconazol já é administrado na terapia de infecções fúngicas em combinação com outros agentes antifúngicos para aumentar seu efeito e, assim, reduzir o uso de outros que apresentam maior citotoxicidade, como a Anfotericina B (Vitale, 2021). Portanto, a combinação de óleos essenciais com Fluconazol reduziria o tempo de internação do paciente e as chances de o paciente apresentar efeitos adversos devido ao uso prolongado do agente antifúngico padrão e à resistência antifúngica adquirida.

Até onde se sabe, combinações desses óleos essenciais e antifúngicos (Fluconazol e Anfotericina B) não foram previamente investigadas contra *C. albicans*. No entanto, esses óleos são caracterizados por uma grande quantidade de limoneno, que também possui efeito antimicrobiano e interações sinérgicas relatadas com o Fluconazol. Esse composto aumenta a eficácia do Fluconazol ao promover a quimiossensibilização das células de *Candida* ao antifúngico (Ahmedi *et al.*, 2024). A sinergia com o Fluconazol é frequentemente observada com óleos essenciais de várias plantas (Soulamani *et al.*, 2019; Soulamani *et al.*, 2021), enquanto a sinergia com a Anfotericina B (um polieno) parece ser menos consistente, muitas vezes mostrando efeitos indiferentes (Nafis *et al.*, 2021) e até antagônicos (Elhidar *et al.*, 2019) em diferentes estudos.

**Tabela 6.** Teste de *Checkerboard* dos óleos essenciais *C. limon* e *C. sinensis* combinados com os antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol, e combinados entre si contra a cepa ATCC 90028.

Combinações	Individual	Combinado	ICIF	Efeito
<i>C. limon</i>	0,312	0,312	2	Indiferente
Anfotericina B	0,5	0,5		
<i>C. limon</i>	0,312	0,156	0,75	Aditivo
Fluconazol	1	0,25		
<i>C. sinensis</i>	1,25	1,25	2	Indiferente
Anfotericina B	0,5	0,5		
<i>C. sinensis</i>	1,25	0,156	0,37	Sinérgico
Fluconazol	1	0,25		
<i>C. limon</i>	0,312	0,312	2	Indiferente
<i>C. sinensis</i>	1,25	1,25		

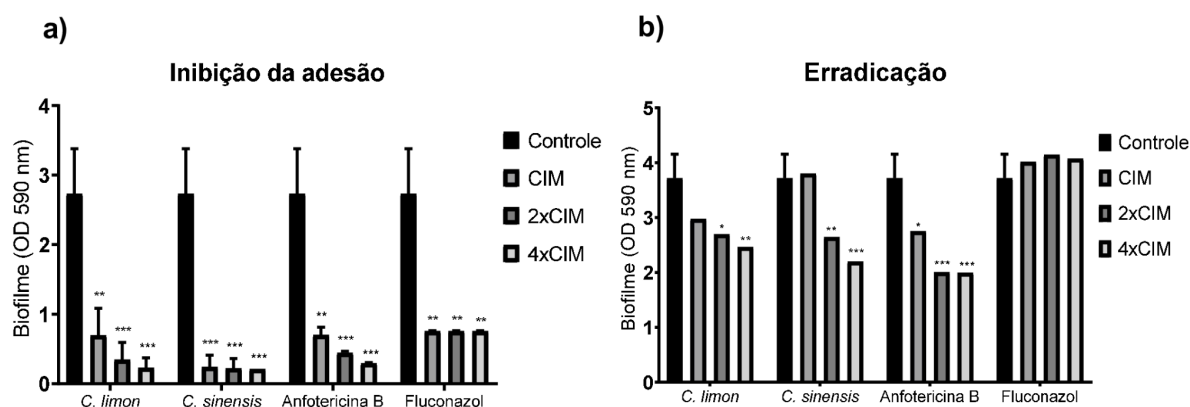
ICIF < ou = 0,5, efeito sinérgico, ICIF >0,5 ou <1,0 aditivo, ICIF > 1,0 e < ou = 4,0 indiferente e ICIF > 4,0 antagonico.

### 6.5. Ensaio de inibição do biofilme

As células do biofilme tratadas com *C. limon* apresentaram 74,54% de inibição da adesão na concentração CIM, 87,36% em 2xCIM e 91,58% em 4xCIM. *C. sinensis* apresentou 82,42% de inibição na concentração CIM, 91,95% em 2xCIM e 92,31% em 4xCIM. A Anfotericina B, na concentração CIM, eliminou 74,36% das células, 83,7% em 2xCIM e 89,2% em 4xCIM. Os tratamentos com Fluconazol apresentaram 72,35% de inibição em todas as concentrações testadas (Gráfico 1a). Os efeitos antiadesão apresentados pelos óleos essenciais são importantes para prevenir a formação de biofilme. *C. sinensis* apresentou melhores resultados antiadesão do que *C. limon*, mesmo que a concentração CIM de *C. limon* seja menor do que a de *C. sinensis*. A adesão é um dos principais fatores de virulência de *C. albicans* e um dos iniciadores de focos infecciosos (Talapko *et al.*, 2021).

Em relação à erradicação do biofilme maduro, os compostos não apresentaram redução significativa na biomassa madura em comparação com os controles de crescimento. *C. limon* eliminou apenas 19,95% na CIM, 27,5% em 2xCIM e 33,69% em 4xCIM. *C. sinensis* não apresentou inibição na CIM, eliminou 28,84% em 2xCIM e 40,97% em 4xCIM. Nos controles tratados com Anfotericina B, houve redução de 25,88% na CIM, 46,1% em 2xCIM e 46,37% em 4xCIM. O Fluconazol não apresentou inibição em nenhum dos tratamentos (Gráfico 1b). As células do biofilme são protegidas de ações externas e, uma vez

formado o biofilme, torna-se mais difícil eliminar as células devido à sua alta resistência, visto que o biofilme possui seus próprios mecanismos de resistência antifúngica, como a matriz extracelular, que limita a ligação dos fármacos aos sítios de ação. Neste contexto, embora o composto não tenha apresentado atividade significativa na eliminação do biofilme maduro, demonstrou um forte efeito antiadesão. Essas propriedades antiadesão dos óleos essenciais de *Citrus* contra *C. albicans* demonstram que eles são boas alternativas para a terapia de bloqueio. Na prática clínica, a terapia de bloqueio é uma alternativa para prevenir a formação de biofilme em cateteres ou quando a substituição do cateter não é possível. Ela impede a progressão da infecção e evita que a formação de biofilme dificulte ainda mais a terapia (Kovács; Majoros, 2022).

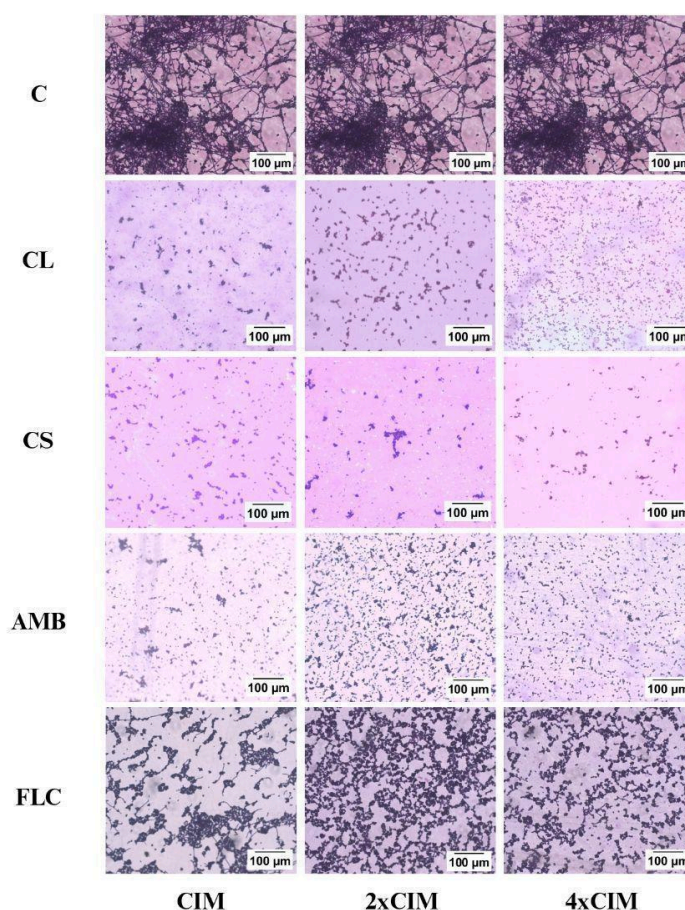


**Gráfico 1.** Efeito dos óleos essenciais das folhas de *C. limon* e *C. sinensis* na inibição da adesão do biofilme (a) e na erradicação do biofilme maduro (b) de *C. albicans*. Os dados são expressos como média  $\pm$  desvio padrão dos valores de absorbância do cristal violeta. \*( $p < 0.1$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ) em relação ao controle (sem tratamento).

### 6.6. Efeitos dos óleos de *Citrus* sobre a morfologia de *Candida albicans*

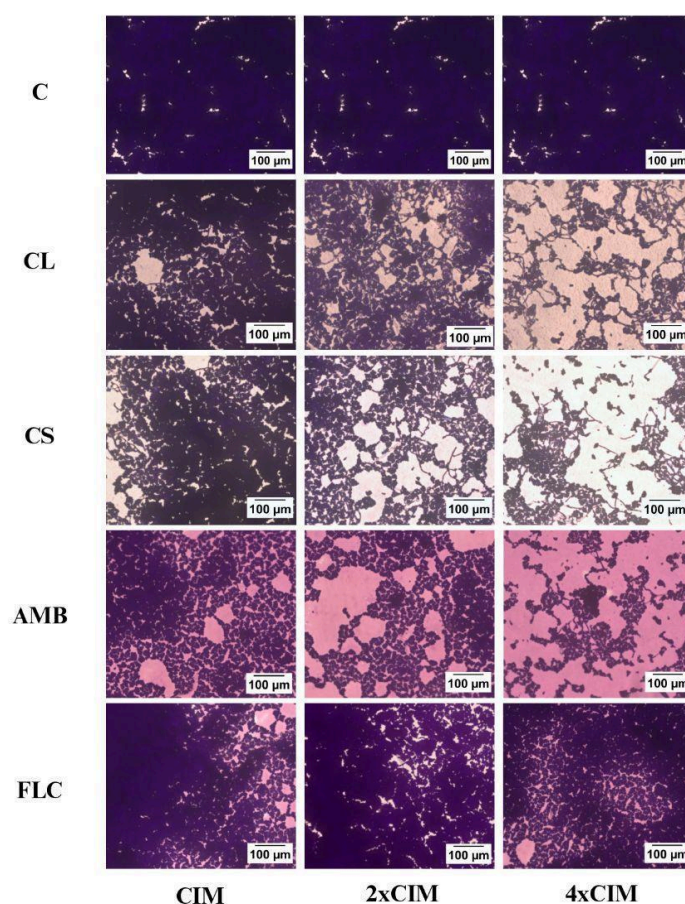
A microscopia das células tratadas com os compostos para avaliar os efeitos na morfologia de *C. albicans* mostrou que os óleos essenciais, além de inibir a formação de biofilme, foram capazes de atuar no polimorfismo, inibindo a formação de hifas e pseudohifas em todas as concentrações testadas (Figura 17). Os efeitos dos óleos cítricos foram semelhantes aos da Anfotericina B, diferentemente do Fluconazol, que ainda apresentou formação de hifas na concentração de 2xCIM (Figura 17). A mudança morfológica de *C. albicans* de blastoconídio para filamentosos é fundamental para sua patogenicidade

oportunista. As estruturas filamentosas são necessárias para a invasão das células fúngicas nas células hospedeiras e atuam na estruturação do biofilme, formando uma estrutura tridimensional e aumentando a espessura da matriz extracelular, protegendo assim as células da ação dos fármacos (Talapko *et al.*, 2021; Atriwal *et al.*, 2021). Ahmedi *et al.* (2022) verificaram que o limoneno tem a capacidade de inibir enzimas de adesão e de transição hifal, prevenindo a formação de biofilme em *C. albicans*. Assim, o efeito fungicida exibido pelos óleos essenciais de *Citrus* está relacionado ao seu principal componente. Isso sugere que os óleos essenciais de *Citrus* apresentam mecanismos de ação com afinidade por adesinas e enzimas polimórficas de *C. albicans*. Os efeitos apresentados pelos óleos essenciais são promissores para o combate à virulência de *C. albicans*, prevenindo a patogenicidade oportunista por meio da inibição do polimorfismo e da adesão e, conseqüentemente, da formação de biofilme.



**Figura 17.** Ensaio da inibição da adesão de biofilme da cepa ATCC 90028 tratadas com os óleos essenciais *C. limon* e *C. sinensis*, e com os antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol, visualizadas em microscópio óptico de luz invertida ZEISS Axio Observer em aumento de 400x. Os controles não foram tratados.

A avaliação dos efeitos de *Citrus* nas células maduras do biofilme tratado mostrou que os óleos essenciais foram capazes de alterar ligeiramente a morfologia. Foi possível observar que eles reduziram a densidade da biomassa já no tratamento CIM, e em 4xCIM as células estão mais espaçadas, mas ainda há células com morfologia filamentosa (Figura 18). As reduções observadas são pequenas em comparação com o controle de crescimento, mas os resultados dos tratamentos com óleos essenciais foram novamente semelhantes aos da Anfotericina B (Figura 18). Radithia *et al.* (2023) observaram que o óleo essencial da casca de *C. limon* danificou a estrutura da matriz extracelular do biofilme de *C. albicans*. Isso foi alcançado pela ruptura da ligação quitina na composição de 1,3- $\beta$ -glucano e pela inibição da síntese de quitinase na formação da matriz extracelular, interrompendo assim a formação de hifas. Os autores associam esse efeito ao limoneno.



**Figura 18.** Ensaio de erradicação do biofilme maduro da cepa ATCC 90028 tratadas com os óleos essenciais *C. limon* e *C. sinensis*, e com os antifúngicos, Anfotericina B e Fluconazol, visualizadas em microscópio óptico de luz invertida ZEISS Axio Observer em aumento de 400x. Os controles não foram tratados.

### 6.7. Atividade hemolítica

Em relação à atividade hemolítica, os óleos essenciais apresentaram valores de  $CL_{50}$  superiores aos dos dois antifúngicos, com *C. limon* apresentando hemólise a 14.000  $\mu\text{g/mL}$  e *C. sinensis* a 13.000  $\mu\text{g/mL}$ , enquanto a Anfotericina B apresentou  $CL_{50}$  a 156  $\mu\text{g/mL}$  e o Fluconazol a 6.000  $\mu\text{g/mL}$  (Gráfico 2). Apresentando menor citotoxicidade em comparação aos dois antifúngicos, *C. limon* apresentou  $CL_{50}$  aproximadamente 40 vezes maior que a CIM da cepa ATCC 90028, que é de 0,312  $\text{mg/mL}$ , e *C. sinensis* 10 vezes maior que a CIM da mesma cepa, que é de 1,25  $\text{mg/mL}$ . Cavalcante *et al.* (2017) avaliaram os valores de hemólise da Anfotericina B, onde o antifúngico foi capaz de promover 70% de hemólise na concentração de 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . Para o Fluconazol, não foram encontrados estudos com eritrócitos humanos. Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os óleos essenciais apresentam faixas de citotoxicidade seguras, sendo promissores em termos de potencial terapêutico.

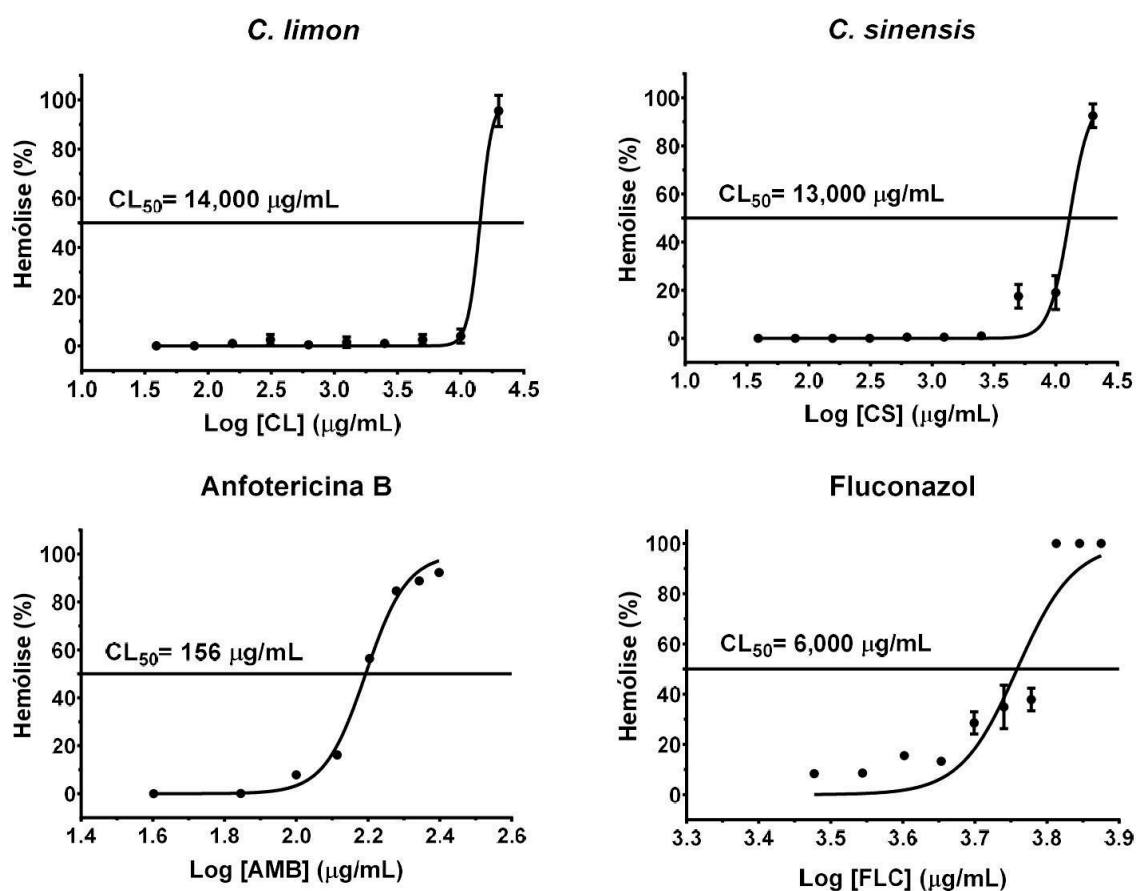


Gráfico 2. Efeito citotóxico de *C. limon* [CL], *C. sinensis* [CS], anfotericina B [AMB] e fluconazol [FLC]. Os

valores de  $CL_{50}$  são indicados na parte superior do gráfico. Os intervalos de confiança de 95% para os óleos foram: [CL]: 13,17 a 15,53; [CS]: 11,84 a 14,24; [AMB]: 152,7 a 159,4; e [FLC]: 6.377 a 7.886. Os resultados são apresentados em porcentagens em relação às células controle não tratadas. Os dados são mostrados como média  $\pm$  desvio padrão de três medições replicadas.

## 6.8. Farmacocinética

Foram realizadas previsões farmacocinéticas para os principais compostos presentes nas espécies de *Citrus* (Tabela 7). Todos os compostos apresentaram alta solubilidade em água, com valores  $\leq 4$  indicando compostos solúveis. Todos os compostos também apresentaram excelentes valores de absorção intestinal, bem acima do limiar de 30% que indica absorção pelo intestino delgado. Outro parâmetro para avaliar a absorção intestinal é a permeabilidade ao  $CaCO_2$ , calculada como o logaritmo do coeficiente de permeabilidade aparente ( $\log P_{app}$ , cm/s), cujo valor limite, que indica a capacidade de absorção intestinal, é superior a 0,9 cm/s. Apenas o eucaliptol apresentou baixa permeabilidade cutânea, com um parâmetro limite de  $\log K_p > -2$ . Os demais compostos apresentaram permeabilidades entre  $\log K_p$  -1,342 e 1,721. O limoneno e o eucaliptol foram considerados substratos para a glicoproteína P; no entanto, nenhum dos compostos foi considerado inibidor para os modelos de glicoproteína P I e glicoproteína P II.

Para avaliar a distribuição dos compostos, utilizamos o VDss (Volume de Distribuição no Estado Estável), a fração livre no plasma e a permeabilidade da barreira hematoencefálica. O VDss é considerado baixo se inferior a 0,71 L/kg ( $\log VDss < -0,15$ ) e alto se superior a 2,81 L/kg ( $\log VDss > 0,45$ ).  $\beta$ -pineno, eucaliptol e sabineno apresentaram os maiores índices de VDss, com valores acima de 0,19 log L/kg, indicando sua capacidade de se distribuir mais amplamente pelos tecidos. A fração livre do fármaco no plasma é essencial não apenas para avaliar a segurança e os efeitos adversos do medicamento, especialmente em pacientes com hipoalbuminemia. Todos os compostos foram capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. Essa permeabilidade prevista à barreira hematoencefálica sugere que o composto possui propriedades farmacocinéticas potencialmente relevantes para aplicações no sistema nervoso central. No entanto, essa inferência baseia-se unicamente em previsões *in silico* e não fornece indícios diretos sobre a eficácia terapêutica em infecções do SNC, que dependem de validação experimental adicional.

O metabolismo de fármacos envolve enzimas do citocromo P450. O limoneno foi o único composto que inibiu a isoforma CYP1A2, sugerindo que os outros compostos têm

atividade com toxicidade mínima. Nenhum dos fármacos foi previsto como substrato para a proteína OCT2 específica dos rins e, portanto, não são transportados por essa proteína, podendo ser eliminados por outras vias disponíveis, como bile, respiração, fezes e suor.

Para avaliar a toxicidade, foram utilizados os parâmetros do AMES (Sistema de Avaliação de Mutagenicidade), que avaliam se um composto tem potencial mutagênico. O *hERG* é uma proteína que regula a atividade elétrica do coração. Inibidores dessa proteína levam a arritmias ventriculares que podem ser fatais. Portanto, avaliar a inibição do *hERG* I/II é um aspecto crítico do desenvolvimento de fármacos para evitar a cardiotoxicidade. O potencial citotóxico contra a pele e o fígado foi avaliado. Nenhum composto apresentou toxicidade usando os parâmetros do AMES, inibição do *hERG* I/II ou hepatotoxicidade. No entanto, limoneno, citronelal e eucaliptol foram avaliados como tóxicos para a pele. Portanto, esses compostos apresentam toxicidade seletiva, pois não afetam outros órgãos, como o coração e o fígado, em níveis que causam toxicidade sistêmica.

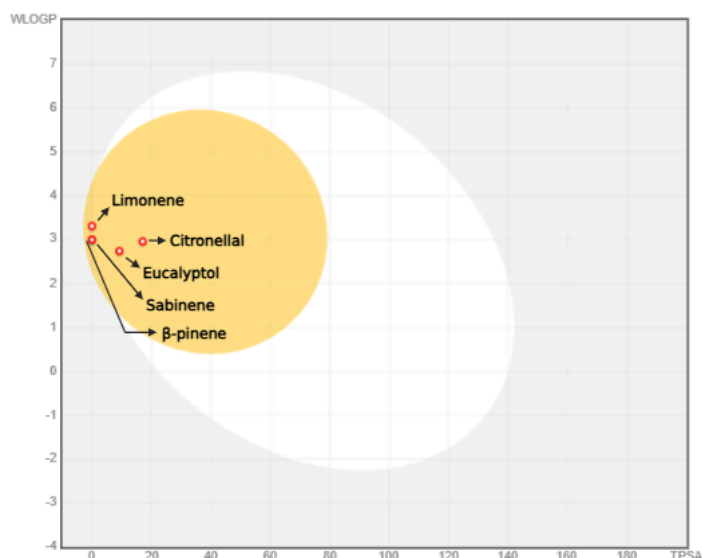
**Tabela 7.** Predição ADMET dos compostos em maiores concentrações na constituição química dos óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis*.

	<b>Limoneno</b>	<b><math>\beta</math>-pineno</b>	<b>Citronelal</b>	<b>Eucaliptol</b>	<b>Sabineno</b>	<b>Unidade</b>
	<b>Absorção</b>					
Solubilidade em água	-3,568	-4,191	-3,465	-2,630	-4,629	Numérico (log mol/L)
Permeabilidade de $\text{Caco}_2$	1,401	1,385	1,503	1,485	1,404	Numérico (log Papp em $10^{-6}$ cm/s)
Absorção intestinal	95,898	95,525	95,359	96,505	95,356	Numérico (% absorvido)
Permeabilidade de cutânea	-1,721	-1,653	-1,386	-2,437	-1,342	Numérico (log Kp)



Inibidor CYP2D6	Não	Não	Não	Não	Não	Catagórico (Sim/Não)
Inibidor CYP3A4	Não	Não	Não	Não	Não	Catagórico (Sim/Não)
<b>Excreção</b>						
Depuração total	0,213	0,030	0,476	1,009	0,071	Numérico (log ml/min/kg)
Substrato OCT2 renal	Não	Não	Não	Não	Não	Catagórico (Sim/Não)
<b>Toxicidade</b>						
Toxicidade AMES	Não	Não	Não	Não	Não	Catagórico (Sim/Não)
Inibidores hERG I/II	Não	Não	Não	Não	Não	Catagórico (Sim/Não)
Sensibilização cutânea	Sim	Não	Sim	Sim	Não	Catagórico (Sim/Não)
Hepatotoxicidade	Não	Não	Não	Não	Não	Catagórico (Sim/Não)

A absorção gastrointestinal e a passagem pela barreira hematoencefálica dos compostos selecionados também foram representadas pela previsão do ovo cozido (Figura 19). Os compostos presentes na zona amarela do gráfico do ovo cozido podem permear a barreira hematoencefálica (BHE). Nesse caso, todos os compostos são capazes de atravessar a barreira, conforme previsto anteriormente pelas análises de distribuição ADMET.



**Figura 19.** Predição *BOILED-Egg* da capacidade de absorção gastrointestinal e da passagem pela barreira hematoencefálica pelos compostos dos óleos essenciais de *Citrus*.

Os resultados da previsão farmacocinética deste estudo corroboram os obtidos por Sánchez-Martínez *et al.* (2021), que realizaram alterações *in silico* e testes experimentais de constituintes de *Citrus*, onde o limoneno e o  $\beta$ -pineno mostraram solubilidade em água e boa absorção intestinal, e que a capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e a distribuição tecidual são características observadas em monoterpenos de *Citrus*, além de baixa toxicidade. Assim, confirmando perfis seguros para uso como terapia alternativa.

No entanto, apesar dos óleos demonstrarem ser eficientes e seguros de acordo com as propriedades ADMET, é importante destacar que existem limitações ao seu uso *in silico* para o estudo dessas propriedades. Entre essas limitações estão o pequeno tamanho dos bancos de dados de referência e o fato de que os presentes nesses bancos de dados podem ser muito simples e ter pouca semelhança com as estruturas modernas usadas em projetos de descoberta de fármacos (Niu *et al.*, 2024).

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que os óleos essenciais de *C. limon* e *C. sinensis* exibem atividade antifúngica significativa contra *C. albicans*. Ambos contêm limoneno como composto majoritário, seguido por outros hidrocarbonetos monoterpênicos. Os óleos também apresentaram importante efeito sinérgico com o Fluconazol, o que abre novas possibilidades na terapia convencional, aumentando a eficácia e reduzindo a resistência do microrganismo. As propriedades ADMET dos compostos majoritários revelaram que os óleos são seguros e eficazes. Os dados de citotoxicidade também corroboram a segurança dos óleos, uma vez que apresentaram baixo efeito citotóxico sobre os eritrócitos. Os efeitos antiadesão e polimórficos reforçam os achados, atuando contra dois fatores de virulência que favorecem a patogenicidade de *C. albicans*. Essas propriedades tornam esses compostos candidatos promissores para uso em terapia de bloqueio de biofilme, que visa prevenir a formação desses biofilmes em dispositivos médicos ou tecidos humanos. No entanto, estudos futuros são necessários para investigar sua aplicação *in vivo* e elucidar os mecanismos moleculares envolvidos em sua ação antifúngica.

## REFERÊNCIAS

- ABDELMOHSEN, U.R.; ELMAIDOMY, A.H. Exploring the therapeutic potential of essential oils: A review of composition and influencing factors. **Frontiers in Natural Products**, v. 4, p. 1490511, 2025.
- ABEDELMAKSOUND, T.G. *et al.* Bioactive Compounds of Plant-Based Food: Extraction, Isolation, Identification, Characteristics, and Emerging Applications. **Food Science & Nutrition**, v. 13, n. 6, p. e70351, 2025.
- ABE, M. *et al.* Microbiological characteristics and drug resistance rates of *Candida auris* isolates in Japan. **Japanese Journal of Infectious Diseases**, v. 78, n. 6, p. 179-185, 2025.
- ABIFARIN, T.O.; OTUNOLA, G.A.; AFOLAYAN, A.J. Chemical composition of essential oils obtained from *Heteromorpha arborescens* (Spreng.) cham. and schltld leaves using two extraction methods. **The Scientific World Journal**, v. 2020, n. 1, p. 9232810, 2020.
- ABUBAKAR, A.R.; HAQUE, M. Preparation of medicinal plants: Basic extraction and fractionation procedures for experimental purposes. **Journal of Pharmacy and Bioallied Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-10, 2020.
- ABDULGHANI, M. *et al.* Proteomic profile of *Candida albicans* biofilm. **Journal of Proteomics**, v. 265, p. 104661, 2022.
- ADAMS, R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectroscopy. **4.1th Edition, Allured Publishing Corporation**, Carol Stream, IL, USA, 2017.
- AGARWAL, P. *et al.* Citrus essential oils in aromatherapy: Therapeutic effects and mechanisms. **Antioxidants**, v. 11, n. 12, p. 2374, 2022.
- AHMEDI, S. *et al.* Limonene inhibits virulence associated traits in *Candida albicans*: *In-vitro* and *in-silico* studies. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 3, p. 100285, 2022.
- AHMEDI, S. *et al.* Limonene synergistically augments fluconazole susceptibility in clinical *Candida* isolates from cleft lip and palate patients. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 15, n. 1, p. 47-54, 2024.
- AJETUNMOBI, O.H. *et al.* Antifungal therapy of *Candida* biofilms: Past, present and future. **Biofilm**, v. 5, p. 100126, 2023.
- AKINOSOGLU, K. *et al.* Amphotericin B in the era of new antifungals: where will it stand?. **Journal of Fungi**, v. 10, n. 4, p. 278, 2024.
- AL-KHAYRI, J.M. *et al.* Flavonoids as potential anti-inflammatory molecules: A review. **Molecules**, v. 27, n. 9, p. 2901, 2022.
- ALMEIDA JR, J.N.D. *et al.* Emergence of *Candida auris* in Brazil in a COVID-19 intensive care unit. **Journal of fungi**, v. 7, n. 3, p. 220, 2021.

ALSHEIKH, H.M.A. *et al.* Plant-based phytochemicals as possible alternative to antibiotics in combating bacterial drug resistance. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 480, 2020.

AMBROSIO, C.M.S. *et al.* Chemical composition and antibacterial and antioxidant activity of a *Citrus* essential oil and its fractions. **Molecules**, v. 26, n. 10, p. 2888, 2021.

ANWAR, T. *et al.* *Citrus sinensis* peel oil extraction and evaluation as an antibacterial and antifungal agent. **Microorganisms**, v. 11, n. 7, p. 1662, 2023.

APPELHANS, M.S. *et al.* A new subfamily classification of the *Citrus* family (Rutaceae) based on six nuclear and plastid markers. **Taxon**, v. 70, n. 5, p. 1035-1061, 2021.

ARASTEHFAR, A. *et al.* The quiet and underappreciated rise of drug-resistant invasive fungal pathogens. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 3, p. 138, 2020.

ASHRIT, P. *et al.* Polymicrobial biofilm dynamics of multidrug-resistant *Candida albicans* and Ampicillin-resistant *Escherichia coli* and antimicrobial inhibition by aqueous garlic extract. **Antibiotics**, v. 11, n. 5, p. 573, 2022.

ATRIWAL, T. *et al.* Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 46-78, 2021.

BADKOUBEH, R.S. *et al.* Caspofungin-induced cardiotoxicity in patients treating for Candidemia. **Toxics**, v. 10, n. 9, p. 521, 2022.

BALDUCCI, E. *et al.* Polysaccharides' structures and functions in biofilm architecture of antimicrobial-resistant (AMR) pathogens. **International journal of molecular sciences**, v. 24, n. 4, p. 4030, 2023.

BAXTER, K.J. *et al.* Time-lapse mesoscopy of *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* dual-species biofilms reveals a structural role for the hyphae of *C. albicans* in biofilm formation. **Microbiology**, v. 170, n. 1, p. 001426, 2024.

BEARDSLEY, J. *et al.* *Candida glabrata* (*Nakaseomyces glabrata*): A systematic review of clinical and microbiological data from 2011 to 2021 to inform the World Health Organization Fungal Priority Pathogens List. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, p. myae041, 2024.

BING, J. *et al.* *Candida auris*-associated hospitalizations and outbreaks, China, 2018–2023. **Emerging Microbes & Infections**, v. 13, n. 1, p. 2302843, 2024.

BORA, H. *et al.* *Citrus* essential oils (CEOs) and their applications in food: An overview. **Plants**, v. 9, n. 3, p. 357, 2020.

BÖTTCHER, B. *et al.* A highly conserved tRNA modification contributes to *C. albicans* filamentation and virulence. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 5, p. e04255-22, 2024.

BRANCO, J.; MIRANDA, I.M.; RODRIGUES, A.G. *Candida parapsilosis* virulence and antifungal resistance mechanisms: a comprehensive review of key determinants. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 80, 2023.

BRENES, L.R. *et al.* A set of diverse genes influence the frequency of white-opaque switching in *Candida albicans*. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 10, n. 8, p. 2593-2600, 2020.

CABALLERO-GALLARDO, K.; QUINTERO-RINCÓN, P.; OLIVERO-VERBEL, J. Aromatherapy and essential oils: holistic strategies in complementary and alternative medicine for integral wellbeing. **Plants**, v. 14, n. 3, p. 400, 2025.

CARPENTER, R.E. *Candida tropicalis* in the diabetic urinary tract: Biofilm resistance, genomic plasticity, and public health implications. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, p. 117005, 2025.

CAPUTO, R. *et al.* Nephrotoxicity of three formulations of amphotericin B: trial sequential analysis. **Archives of Medical Science**, v. 16, n. 1, 2020.

CAROLUS, H. *et al.* Amphotericin B and other polyenes—discovery, clinical use, mode of action and drug resistance. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 4, p. 321, 2020.

CAVALCANTE, C.S.P. *et al.* Anti-fungal activity of Ctn [15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. **The Journal of Antibiotics**, v. 70, n. 3, p. 231-237, 2017.

CEBALLOS-GARZON, A. *et al.* Emergence and circulation of azole-resistant *C. albicans*, *C. auris* and *C. parapsilosis* bloodstream isolates carrying Y132F, K143R or T220L *Erg11p* substitutions in Colombia. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1136217, 2023.

CHEN, L. *et al.* Confronting antifungal resistance, tolerance, and persistence: advances in drug target discovery and delivery systems. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 200, p. 115007, 2023.

CHIOCCHIO, I. *et al.* Plant secondary metabolites: An opportunity for circular economy. **Molecules**, v. 26, n. 2, p. 495, 2021.

CHOW, N.A. *et al.* Tracing the evolutionary history and global expansion of *Candida auris* using population genomic analyses. **MBio**, v. 11, n. 2, p. 10.1128/mbio.03364-19, 2020.

CIMINO, C. *et al.* Essential oils: Pharmaceutical applications and encapsulation strategies into lipid-based delivery systems. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 3, p. 327, 2021.

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.

COOK, A. *et al.* Neonatal invasive candidiasis in low-and middle-income countries: Data from the NeoOBS study. **Medical Mycology**, v. 61, n. 3, p. myad010, 2023.

CORNELY, O.A. *et al.* Global guideline for the diagnosis and management of candidiasis: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 25, n. 5, p. 280-293, 2025.

COSTE, A.T. *et al.* Emerging echinocandin-resistant *Candida albicans* and *glabrata* in Switzerland. **Infection**, v. 48, n. 5, p. 761-766, 2020.

CSIKÓS, E. *et al.* Treatment of benign prostatic hyperplasia by natural drugs. **Molecules**, v. 26, n. 23, p. 7141, 2021.

CUI, H. *et al.* The transcription factor Of1 is critical for white-opaque switching in natural MTL *a/a* isolates of *Candida albicans*. **Molecular Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 275-290, 2024.

DEKA, S. *et al.* Chemical Composition, Antimicrobial Activity and *In Silico* Analysis of Essential Oils from *Citrus limon* (Kaji Nemu) and *Citrus hystrix* (Hati Nemu) Peels Indigenous to North East India. **In Silico Research in Biomedicine**, v. 1, p. 100125, 2025.

DELMA, F.Z. *et al.* Molecular mechanisms of 5-fluorocytosine resistance in yeasts and filamentous fungi. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 11, p. 909, 2021.

D'ENFERT, C. *et al.* The impact of the Fungus-Host-Microbiota interplay upon *Candida albicans* infections: current knowledge and new perspectives. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 45, n. 3, p. fuaa060, 2021.

DONGRE, P. *et al.* Botanical description, chemical composition, traditional uses and pharmacology of *Citrus sinensis*: An updated review. **Pharmacological Research-Modern Chinese Medicine**, v. 8, p. 100272, 2023.

DOSEDĚL, M. *et al.* Vitamin C—sources, physiological role, kinetics, deficiency, use, toxicity, and determination. **Nutrients**, v. 13, n. 2, p. 615, 2021.

DUGGAN, S.; USHER, J. *Candida glabrata*: A powerhouse of resistance. **PLoS Pathogens**, v. 19, n. 10, p. e1011651, 2023.

EIX, E.F.; NETT, J.E. How biofilm growth affects *Candida*-host interactions. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 1437, 2020.

EL HACHLAFI, N. *et al.* Chemical composition and assessment of the anti-inflammatory, antioxidant, cytotoxic and skin enzyme inhibitory activities of *Citrus sinensis* (L.) osbeck essential oil and its major compound limonene. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 12, p. 1652, 2024.

ELHIDAR, N. *et al.* Chemical composition, antimicrobial activities and synergistic effects of essential oil from *Senecio anteuphorbium*, a Moroccan endemic plant. **Industrial Crops and Products**, v. 130, p. 310-315, 2019.

EVBUOMWAN, I.O.; ADEYEMI, O.S.; OLUBA, O.M. Indigenous medicinal plants used in folk medicine for malaria treatment in Kwara State, Nigeria: an ethnobotanical study. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 23, n. 1, p. 324, 2023.

FAN, S. *et al.* Filamentous growth is a general feature of *Candida auris* clinical isolates. **Medical Mycology**, v. 59, n. 7, p. 734-740, 2021.

FATHI, F.; MAHMOUDABADI, A.Z.; FATAHINIA, M. A comparative study on the production of extracellular hydrolytic enzymes of *C. albicans* and non-*albicans Candida* species isolated from HIV+/AIDS patients and healthy individuals. **Current Medical Mycology**, v. 8, n. 2, p. 32, 2022.

FERNGREN, G. *et al.* Epidemiological patterns of candidaemia: A comprehensive analysis over a decade. **Mycoses**, v. 67, n. 5, p. e13729, 2024.

FERRERAS-ANTOLIN, L.; CHOWDHARY, A.; WARRIS, A. Neonatal invasive candidiasis: current concepts. **Indian Journal of Pediatrics**, v. 92, p. 765-773, 2025.

FIDEL, P.L.; YANO, J.; ESHER, S.K. Applying the host-microbe damage response framework to *Candida* pathogenesis: current and prospective strategies to reduce damage. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 35, 2020.

FIOCRUZ. **Brasil Terá Fitoterápico Inovador Com Quebra-pedra**. 2025. Disponível em: <https://fiocruz.br/noticia/2025/12/brasil-tera-fitoterapico-inovador-com-quebra-pedra>. Acesso em: 22 de dezembro de 2025.

FOKAS, R.; GIORMEZIS, N.; VANTARAKIS, A. Synergistic Approaches to Foodborne Pathogen Control: A Narrative Review of Essential Oils and Bacteriophages. **Foods**, v. 14, n. 9, p. 1508, 2025.

FONTENELLE, R.O.S. *et al.* Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 5, p. 934-940, 2007.

FREITAS, V. D. D. *et al.* Antibacterial Activity of Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum*) Against Oxacillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* Isolated from Dogs with Otitis Externa. **Pathogens**, v. 14, n. 7, p. 709, 2025.

FRÍAS-DE-LEÓN, M.G. *et al.* *Candida glabrata* antifungal resistance and virulence factors, a perfect pathogenic combination. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 10, p. 1529, 2021.

FU, Y. *et al.* Antibiofilm efficacy of luteolin against single and dual species of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. **Frontiers in Microbiology**, v. 12, p. 715156, 2021.

GONZÁLEZ-MAS, M. C. *et al.* Volatile compounds in citrus essential oils: A comprehensive review. **Frontiers in Plant Science**, v. 10, p. 12, 2019.

GARBE, E. *et al.* Functional analysis of the *Candida albicans* ECE1 Promoter. **Microbiology Spectrum**, v. 11, n. 2, p. e00253-23, 2023.

GARCIA-BUSTOS, V. *et al.* Characterization of the Differential Pathogenicity of *Candida auris* in a *Galleria mellonella* Infection Model. **Microbiology Spectrum**, v. 9, n. 1, p. 10.1128/spectrum.00013-21, 2021.

GÓMEZ-GAVIRIA, M.; RAMÍREZ-SOTELO, U.; MORA-MONTES, H.M. Non-*albicans Candida* species: immune response, evasion mechanisms, and new plant-derived alternative therapies. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 1, p. 11, 2022.

- GRASSIE, S.S.; KARABIÇAK, N.; ALTINTOP, T.U. *Candida auris* infections in an intensive care unit: Antifungal resistance, mortality rates and infection control interventions. **Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica**, v. 72, n. 2, p. 164–170, 2025.
- GUERRA, S. *et al.* Karyotype variability of sour orange (*Citrus aurantium* L.) and the origin of its heteromorphic karyotypes. **Tree Genetics & Genomes**, v. 16, n. 6, p. 78, 2020.
- GUTZMANN, D.J. *et al.* The role of serum albumin in *Candida albicans* filamentation, germ tube formation, and farnesol sequestration. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 90, n. 12, p. e01626-24, 2024.
- HAJLAOUI, H. *et al.* Antimicrobial, antioxidant, anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, and pharmacokinetic properties of *Carum carvi* L. and *Coriandrum sativum* L. essential oils alone and in combination. **Molecules**, v. 26, n. 12, p. 3625, 2021.
- HAMDAN, M. *et al.* Chemical composition, cytotoxic effects and antimicrobial activity of combined essential oils from *Citrus meyeri*, *Citrus paradise*, and *Citrus sinensis* leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 210, p. 118096, 2024.
- HARO-GONZÁLEZ, J.N. *et al.* Clove essential oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, chemical composition, food applications, and essential bioactivity for human health. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6387, 2021.
- HASSAN, Y.; CHEW, S.Y.; THAN, L.T.L. *Candida glabrata*: pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival. *Journal of Fungi*, v. 7, n. 8, p. 667, 2021.
- HE, H. *et al.* Hypha essential genes in *Candida albicans* pathogenesis of oral lichen planus: an in-vitro study. **BMC Oral Health**, v. 21, n. 1, p. 614, 2021.
- HERNANDO-ORTIZ, A. *et al.* *Caenorhabditis elegans* as a model system to assess *Candida glabrata*, *Candida nivariensis*, and *Candida bracarensis* virulence and antifungal efficacy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 10, p. 10.1128/aac.00824-20, 2020.
- HONG, S. *et al.* Pullulan nanoparticles inhibit the pathogenicity of *Candida albicans* by regulating hypha-related gene expression. **Microbiology Spectrum**, v. 12, n. 12, p. e01048-24, 2024.
- HONORATO, L. *et al.* Extracellular vesicles regulate biofilm formation and yeast-to-hypha differentiation in *Candida albicans*. **MBio**, v. 13, n. 3, p. e00301-22, 2022.
- HUNG, N.H. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory activities of essential oils from Vietnamese traditional medicinal plants. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 7092, 2022.
- IRIANTO, V.S. *et al.* Spatial structure of yeast biofilms and the role of cell adhesion across different media. **Biofilm**, v. 10, p. 100306, 2025.
- IVANOVA, S. *et al.* Essential oils—a review of the natural evolution of applications and some future perspectives. **Pharmacia**, v. 72, p. 1-12, 2025.

- JAIN, K. *et al.* Genomic analyses reveal high diversity and rapid evolution of *Pichia kudriavzevii* within a neonatal intensive care unit in Delhi, India. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 69, n. 3, p. e01709-24, 2025.
- JOHNSON, J.B. *et al.* Unlocking the sublime: A review of native Australian citrus species. **Foods**, v. 14, n. 14, p. 2425, 2025.
- JOHNSON, M.D. Antifungals in clinical use and the pipeline. **Infectious Disease Clinics**, v. 35, n. 2, p. 341-371, 2021.
- JOHNSON, M.D. *et al.* Combination antifungal therapy. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 693-715, 2004.
- JUNG, P. *et al.* *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 1453-1465, 2020.
- KAČÁNIOVÁ, M. *et al.* *Citrus limon* essential oil: chemical composition and Selected biological properties focusing on the antimicrobial (*in vitro*, *in situ*), Antibiofilm, Insecticidal activity and preservative effect against *Salmonella enterica* inoculated in carrot. **Plants**, v. 13, n. 4, p. 524, 2024.
- KARKOWSKA-KULETA, J. *et al.* *Candida albicans* biofilm-derived extracellular vesicles are involved in the tolerance to caspofungin, biofilm detachment, and fungal proteolytic activity. **Journal of Fungi**, v. 9, n. 11, p. 1078, 2023.
- KATSIPOULAKI, M. *et al.* *Candida albicans* and *Candida glabrata*: global priority pathogens. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 2, p. e00021-23, 2024.
- KAUR, J.; NOBILE, C.J. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. **Current Opinion in Microbiology**, v. 71, p. 102237, 2023.
- KARADAĞ, F.Y. *et al.* Evaluation of candidemia cases in the intensive care unit of a tertiary training hospital during the period of COVID-19 pandemic. **BMC Infectious Diseases**, v. 25, n. 1, p. 288, 2025.
- KHALIFA, H.O. *et al.* Prevalence of antifungal resistance, genetic basis of acquired azole and echinocandin resistance, and genotyping of *Candida krusei* recovered from an international collection. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 66, n. 2, p. e01856-21, 2022.
- KIDD, S.E.; ABDOLRASOULI, A.; HAGEN, F. Fungal nomenclature: managing change is the name of the game. **Open forum infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. ofac559, 2023.
- KIM, J.S.; CHA, H.; BAHN, Y.S. Comprehensive overview of *Candida auris*: an emerging multidrug-resistant fungal pathogen. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 1365, 2024.
- KOUNTCHOU, C.L. *et al.* Antifungal Resistance Profile, Biofilm Formation, and Virulence Factor Production in *Candida krusei* Isolates From HIV-Infected Patients in Cameroon. **Cureus**, v. 15, n. 8, 2023.

KOVÁCS, F. *et al.* Epidemiology, clinical characteristics, outcome and biofilm forming properties in candidaemia: A single-centre retrospective 4-year analysis from Hungary. **Mycoses**, v. 67, n. 4, p. e13727, 2024.

KYAW, Y.M.M. *et al.* Traditional medicinal plants used by the Mon people in Myanmar. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113253, 2021.

KYRIAKOUDI, A. *et al.* Innovative delivery systems loaded with plant bioactive ingredients: Formulation approaches and applications. **Plants**, v. 10, n. 6, p. 1238, 2021.

KLIMEK-SZCZYKUTOWICZ, M.; SZOPA, A.; EKIERT, H.. *Citrus limon* (Lemon) phenomenon—a review of the chemistry, pharmacological properties, applications in the modern pharmaceutical, food, and cosmetics industries, and biotechnological studies. **Plants**, v. 9, n. 1, p. 119, 2020.

KODAD, H. *et al.* Antimicrobial Potential of *Citrus limon* Peel Essential Oil from Morocco: A Sustainable Approach to *Citrus* Waste Valorization. **Research in Ecology**, v. 7, n. 5, p. 302-317, 2025.

KOVÁCS, R.; MAJOROS, L. Antifungal lock therapy: an eternal promise or an effective alternative therapeutic approach?. **Letters in Applied Microbiology**, v. 74, n. 6, p. 851-862, 2022.

KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS yeast research**, v. 14, n. 7, p. 1068-1079, 2014.

LAFTOUHI, A. *et al.* The impact of environmental stress on the secondary metabolites and the chemical compositions of the essential oils from some medicinal plants used as food supplements. **Sustainability**, v. 15, n. 10, p. 7842, 2023.

LAPAQUETTE, P. *et al.* Membrane protective role of autophagic machinery during infection of epithelial cells by *Candida albicans*. **Gut Microbes**, v. 14, n. 1, p. 2004798, 2022.

LASH, E. *et al.* *Ent2* governs morphogenesis and virulence in part through regulation of the *Cdc42* signaling cascade in the fungal pathogen *Candida albicans*. **Mbio**, v. 14, n. 2, p. e03434-22, 2023.

LASS-FLÖRL, C. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 10, n. 1, p. 20, 2024.

LEE, Y.; ROBBINS, N.; COWEN, L.E. Molecular mechanisms governing antifungal drug resistance. **NPJ Antimicrobials and Resistance**, v. 1, n. 1, p. 5, 2023.

LI, Y. *et al.* The effect of developmental and environmental factors on secondary metabolites in medicinal plants. **Plant physiology and biochemistry**, v. 148, p. 80-89, 2020.

LING, Q. *et al.* Chemical composition and antioxidant activity of the essential oils of citral-rich chemotype *Cinnamomum camphora* and *Cinnamomum bodinieri*. **Molecules**, v. 27, n. 21, p. 7356, 2022.

- LIU, F. *et al.* Phylogenomic analysis of the *Candida auris*-*Candida haemuli* clade and related taxa in the *Metschnikowiaceae*, and proposal of thirteen new genera, fifty-five new combinations and nine new species. **Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi**, v. 52, n. 1, p. 22-43, 2024.
- LOPES, J.P.; LIONAKIS, M.S. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. **Virulence**, v. 13, n. 1, p. 89-121, 2022.
- LU, H. *et al.* *Candida albicans* targets that potentially synergize with fluconazole. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 323-337, 2021.
- MAKLED, A.F. *et al.* Characterization of *Candida* species isolated from clinical specimens: insights into virulence traits, antifungal resistance and molecular profiles. **BMC Microbiology**, v. 24, n. 1, p. 388, 2024.
- MALLICK, D.C. *et al.* 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.
- MARTORANO-FERNANDES, L. *et al.* *Candida albicans* adhesins *Als1* and *Hwp1* modulate interactions with *Streptococcus mutans*. **Microorganisms**, v. 11, n. 6, p. 1391, 2023.
- MASHALY, G.E.S.; ZEID, M.S. *Candida albicans* genotyping and relationship of virulence factors with fluconazole tolerance in infected pediatric patients. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 2035-2043, 2022.
- MASSARO, I.; THOMSON, J.; LEICHTY, A.R. Diploid assembly of the Mexican lime genome. *G3: Genes, Genomes*, **Genetics**, v. 15, n. 11, p. jkaf219, 2025.
- MASSEY, J.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D.. Role of the extracellular matrix in *Candida* biofilm antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 47, n. 6, p. fuad059, 2023.
- MASYITA, A. *et al.* Terpenes and terpenoids as main bioactive compounds of essential oils, their roles in human health and potential application as natural food preservatives. **Food chemistry: X**, v. 13, p. 100217, 2022.
- MCCALL, A.D. *et al.* *Candida albicans* biofilm development is governed by cooperative attachment and adhesion maintenance proteins. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 5, n. 1, p. 21, 2019.
- MIN, K.; PARK, A.. Shape-Shifting Mechanisms: Integrative Multi-Omics Insights Into *Candida albicans* Morphogenesis. **Mycobiology**, v. 53, n. 2, p. 250-257, 2025.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Plantas medicinais e fitoterápicos**. 2025. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/plantas-medicinais-e-fitoterapicos>. Acesso em: 19 de fevereiro de 2025.
- MISHRA, S. *et al.* Biofilm-mediated bioremediation is a powerful tool for the removal of environmental pollutants. **Chemosphere**, v. 294, p. 133609, 2022.

MITCHELL, K.F.; ZARNOWSKI, R.; ANDES, D.R. Fungal super glue: the biofilm matrix and its composition, assembly, and functions. **PLoS pathogens**, v. 12, n. 9, p. e1005828, 2016.

MORADI, M. *et al.* The effect of aromatherapy with *Citrus aurantium* essential oil on depression, stress and anxiety in pregnant women; a randomized controlled clinical trial. **Taiwanese Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 64, n. 3, p. 512-518, 2025.

MOURER, T. *et al.* The Pga59 cell wall protein is an amyloid forming protein involved in adhesion and biofilm establishment in the pathogenic yeast *Candida albicans*. **NPJ Biofilms and Microbiomes**, v. 9, n. 1, p. 6, 2023.

MROCZYŃSKA, M.; BRILLOWSKA-DĄBROWSKA, A. Virulence of clinical *Candida* isolates. **Pathogens**, v. 10, n. 4, p. 466, 2021.

MUHAMMAD, F. *et al.* Rose essential oil diminishes dopaminergic neuron degenerations and reduces  $\alpha$ -synuclein aggregation in *Caenorhabditis elegans* models of Parkinson's disease. **Phytotherapy Research**, v. 37, n. 7, p. 2877-2893, 2023.

MUHAMMAD, M.H. *et al.* Beyond risk: bacterial biofilms and their regulating approaches. **Frontiers in microbiology**, v. 11, p. 928, 2020.

NAFIS, A. *et al.* New insight into antimicrobial activities of *Linaria ventricosa* essential oil and its synergetic effect with conventional antibiotics. **Archives of Microbiology**, v. 203, n. 7, p. 4361-4366, 2021.

NAJMI, A. *et al.* Modern approaches in the discovery and development of plant-based natural products and their analogues as potential therapeutic agents. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 349, 2022.

NETT, J.E.; ANDES, D.R. Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. **Journal of Fungi**, v. 6, n. 1, p. 21, 2020.

NGECE, K. *et al.* Polyene-based derivatives with antifungal activities. **Pharmaceutics**, v. 16, n. 8, p. 1065, 2024.

NGUYEN, T.A. *et al.* *Pichia kudriavzevii* (*Candida krusei*): A systematic review to inform the World Health Organisation priority list of fungal pathogens. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, p. myad132, 2024.

NIDHI, P. *et al.* Synergistic potential of *Citrus aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 262, p. 113135, 2020.

NIU, Z. *et al.* PharmaBench: Enhancing ADMET benchmarks with large language models. **Scientific Data**, v. 11, n. 1, p. 985, 2024.

NOPPÈ, E. *et al.* A Narrative Review of Invasive Candidiasis in the Intensive Care Unit. **Therapeutic Advances in Pulmonary and Critical Care Medicine**, v. 19, p. 29768675241304684, 2024.

OKANO, S. *et al.* The Effects of Frankincense Essential Oil on Stress in Rats. **Journal of Oleo Science**, v. 68, p.1003-1009, 2019.

PAPPAS, P.G. *et al.* Invasive candidiasis. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-20, 2018.

PARAMBATH, S. *et al.* *Candida albicans* a systematic review to inform the World Health Organization fungal priority pathogens list. **Medical Mycology**, v. 62, n. 6, p. myae045, 2024.

PARDO, H. *et al.* Quality and flavor of ‘Aliza’ fruit: A unique pomelo× mandarin hybrid. **Horticulturae**, v. 9, n. 4, p. 420, 2023.

PARK, Y.N.; STRAUß, A.; MORSCHHÄUSER, J. The white-phase-specific gene *WH11* is not required for white-opaque switching in *Candida albicans*. **Molecular Genetics and Genomics**, v. 272, p. 88-97, 2004.

PARK, Y.N. *et al.* *EFG1* Mutations, phenotypic switching, and colonization by clinical *a/a* strains of *Candida albicans*. **MSphere**, v. 5, n. 1, p. 10.1128/msphere. 00795-19, 2020.

PASDARAN, A. *et al.* A review of *Citrus* plants as functional foods and dietary supplements for human health, with an emphasis on meta-analyses, clinical trials, and their chemical composition. **Clinical Nutrition ESPEN**, v. 54, p. 311-336, 2023.

PAVELA, R. *et al.* Plant extracts for developing mosquito larvicides: From laboratory to the field, with insights on the modes of action. **Acta tropica**, v. 193, p. 236-271, 2019.

PEREIRA, R.B. *et al.* Anti-inflammatory activity of essential oils from Tunisian aromatic and medicinal plants and their major constituents in THP-1 macrophages. **Food Research International**, v. 167, p. 112678, 2023.

PETRETTO, G.L. *et al.* Waste *Citrus limon* leaves as source of essential oil rich in limonene and citral: Chemical characterization, antimicrobial and antioxidant properties, and effects on cancer cell viability. **Antioxidants**, v. 12, n. 6, p. 1238, 2023.

PIERCE, C.G. *et al.* A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. **Nature protocols**, v. 3, n. 9, p. 1494-1500, 2008.

PONDE, N.O. *et al.* *Candida albicans* biofilms and polymicrobial interactions. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 47, n. 1, p. 91-111, 2021.

RADITHIA, D. *et al.* The effectiveness of essential oil from *Citrus limon* peel on *Candida albicans* biofilm formation: An experimental *in vivo* study. **Journal of Taibah University Medical Sciences**, v. 18, n. 1, p. 190-195, 2023.

RATHOD, S.N. *et al.* *Candida auris* outbreak in a cardiothoracic transplant intensive care unit: implications for infection prevention practices and keeping pace with an evolving landscape. **Infection Control & Hospital Epidemiology**, v. 46, n. 8, p. 789-796, 2025.

RAUF, A. *et al.* *In silico*, SwissADME, and DFT studies of newly synthesized oxindole derivatives followed by antioxidant studies. **Journal of Chemistry**, v. 2023, n. 1, p. 5553913, 2023.

RICARDO, E. *et al.* Mechanisms of acquired *in vivo* and *in vitro* resistance to voriconazole by *Candida krusei* following exposure to suboptimal drug concentration. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 64, n. 4, p. 10.1128/aac. 01651-19, 2020.

RIFAI, A. *et al.* Effects of Clove Leaf Essential Oil (*Syzygium aromaticum*) in Inhibiting Biofilm Formation on *Candida albicans* Isolate. **JUXTA: Jurnal Ilmiah Mahasiswa Kedokteran Universitas Airngga, Surabaya**, v.15, n.2, p.70-75 2024.

RODRIGUEZ, D.L. *et al.* Transcriptional circuits regulating developmental processes in *Candida albicans*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 605711, 2020.

ROY, S.; GOW, N.A.R. The role of the *Candida* biofilm matrix in drug and immune protection. **The Cell Surface**, v. 10, p. 100111, 2023.

RIAZ, M. *et al.* Chemical characterization, antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and *in silico* studies of hexane extract and essential oils from *Citrus limon* leaves. **Chemistry & Biodiversity**, v. 20, n. 1, p. e202200537, 2023.

SACHIVKINA, N. *et al.* Effects of farnesol and lyticase on the formation of *Candida albicans* biofilm. **Veterinary World**, v. 13, n. 6, p. 1030, 2020.

SADGROVE, N.J.; PADILLA-GONZÁLEZ, G.F.; PHUMTHUM, M. Fundamental chemistry of essential oils and volatile organic compounds, methods of analysis and authentication. **Plants**, v. 11, n. 6, p. 789, 2022.

SADO, M. *et al.* Physicochemical Properties, Antioxidant and Antimicrobial Activities of Sweet Orange (*Citrus sinensis* L. OSBECK) Fruit Peel and Pulp Oil Extracts. **The Open Biotechnology Journal**, v. 16, n. 1, 2022.

SAGY, I. *et al.* Safety and efficacy of medical cannabis in fibromyalgia. **Journal of clinical medicine**, v. 8, n. 6, p. 807, 2019.

SAINI, R.K. *et al.* Bioactive compounds of *Citrus* fruits: A review of composition and health benefits of carotenoids, flavonoids, limonoids, and terpenes. **Antioxidants**, v. 11, n. 2, p. 239, 2022.

SALLEH, W.M.N.H.W. *et al.* Chemical composition of three Malaysian *Horsfieldia* essential oils. **Natural Product Research**, v. 36, n. 7, p. 1909-1913, 2022.

SÁNCHEZ-MARTÍNEZ, J.D. *et al.* *In vitro* neuroprotective potential of terpenes from industrial orange juice by-products. **Food & Function**, v. 12, n. 1, p. 302-314, 2021.

SATOH, K. *et al.* *Candida auris* sp. nov., a novel ascomycetous yeast isolated from the external ear canal of an inpatient in a Japanese hospital. **Microbiology and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 41-44, 2009.

SEMINARA, S. *et al.* Sweet orange: evolution, characterization, varieties, and breeding perspectives. **Agriculture**, v. 13, n. 2, p. 264, 2023.

SHAN, Q. *et al.* Processing and polyherbal formulation of *Tetradium ruticarpum* (A. Juss.) hartley: Phytochemistry, pharmacokinetics, and toxicity. **Frontiers in pharmacology**, v. 11, p. 133, 2020.

SHARMEEN, J.B. *et al.* Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.

SHIYADEH, Z.S. *et al.* Hospitalized COVID-19 patients with urinary tract infection in Iran: *Candida* species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Antibiotics**, v. 13, n. 7, p. 633, 2024.

SIGERA, L.S.M.; DENNING, D.W. Flucytosine and its clinical usage. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 10, p. 20499361231161387, 2023.

SIONOV, R.V.; STEINBERG, D. Targeting the holy triangle of quorum sensing, biofilm formation, and antibiotic resistance in pathogenic bacteria. **Microorganisms**, v. 10, n. 6, p. 1239, 2022.

SMOLARZ, M. *et al.* Extracellular nucleic acids present in the *Candida albicans* biofilm trigger the release of neutrophil extracellular traps. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, p. 681030, 2021.

SNEHA, K. *et al.* Antimicrobial and larvicidal activities of different *Ocimum* essential oils extracted by ultrasound-assisted hydrodistillation. **Molecules**, v. 27, n. 5, p. 1456, 2022.

SOBEL, J.D. Resistance to fluconazole of *Candida albicans* in vaginal isolates: a 10-year study in a clinical referral center. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 67, n. 5, p. e00181-23, 2023.

SOLL, D.R. White-opaque switching in *Candida albicans*: cell biology, regulation, and function. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 88, n. 2, p. e00043-22, 2024.

SONG, Y.D. *et al.* *Candida tropicalis* RON1 is required for hyphal formation, biofilm development, and virulence but is dispensable for N-acetylglucosamine catabolism. **Medical Mycology**, v. 59, n. 4, p. 379-391, 2021.

SORIANO-ABARCA, M. *et al.* Virulence-related genes expression in planktonic mixed cultures of *Candida albicans* and non-*albicans* *Candida* species. **Microbial Physiology**, v. 34, n. 1, p. 243-254, 2024.

SOULAIMANI, B. *et al.* Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic potential of essential oil from endemic *Lavandula maroccana* (Mill.). **South African Journal of Botany**, v. 125, p. 202-206, 2019.

- SOULAIMANI, B. *et al.* Synergistic anticandidal effects of six essential oils in combination with fluconazole or amphotericin B against four clinically isolated *Candida* strains. **Antibiotics**, v. 10, n. 9, p. 1049, 2021.
- SOUSA, D.P.D. *et al.* Essential oils: Chemistry and pharmacological activities. **Biomolecules**, v. 13, n. 7, p. 1144, 2023.
- SOUZA, C.M.D. *et al.* Deciphering colonies of phenotypic switching-derived morphotypes of the pathogenic yeast *Candida tropicalis*. **Mycopathologia**, v. 187, n. 5, p. 509-516, 2022.
- SOUZA, C.M.D. *et al.* Enhanced biofilm formation by *Candida tropicalis* morphotypes under host-mimicking conditions: Insights into cell wall modifications and gene expression. **Microbial Pathogenesis**, p. 107807, 2025.
- SOUZA, P.D. *et al.* Promising medicinal plants with diuretic potential used in Brazil: State of the art, challenges, and prospects. **Planta Medica**, v. 87, n. 02, p. 24-37, 2021.
- STAMOVA, S. *et al.* Antimicrobial Activity of Lavender Essential Oil from *Lavandula angustifolia* Mill.: *In Vitro* and *In Silico* Evaluation. **Antibiotics**, v. 14, n. 7, p. 656, 2025.
- STAVROU, A.A. *et al.* The changing spectrum of Saccharomycotina yeasts causing candidemia: phylogeny mirrors antifungal susceptibility patterns for azole drugs and amphotericin B. **FEMS Yeast Research**, v. 19, n. 4, p. foz037, 2019.
- SUN, Z. *et al.* Vulvovaginal candidiasis and vaginal microflora interaction: Microflora changes and probiotic therapy. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1123026, 2023.
- SUSAN, V. *et al.* Antifungal Drugs for the Treatment of Invasive Fungal Infections—A Limited Therapeutic Toolbox Facing Growing Resistances. **Pharmaceuticals**, v. 18, n. 8, p. 1220, 2025.
- SZYMAŃSKI, M. *et al.* Echinocandins—structure, mechanism of action and use in antifungal therapy. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 37, n. 1, p. 876-894, 2022.
- TAKASHIMA, M.; SUGITA, T. Taxonomy of Pathogenic Yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon* Current Status, Future Perspectives, and Proposal for Transfer of Six *Candida* Species to the Genus *Nakaseomyces*. **Medical Mycology Journal**, v. 63, n. 4, p. 119-132, 2022.
- TALAPKO, J. *et al.* *Candida albicans* - the virulence factors and clinical manifestations of infection. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 2, p. 79, 2021.
- TALIB, W.H. *et al.* Plant-derived natural products in cancer research: extraction, mechanism of action and drug formulation. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5319, 2020.
- TEJADA-MUÑOZ, S. *et al.* Antimicrobial Activity of *Origanum vulgare* Essential Oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Pharmaceuticals**, v. 17, n. 11, p. 1430, 2024.

- TEIXEIRA, M.M. *et al.* New antifungal agents with azole moieties. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 11, p. 1427, 2022.
- THAKRE, A. *et al.* Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**, v. 56, n. 5, p. 565-578, 2018.
- UDOURIOH, G. A. *et al.* Therapeutic characteristics of essential oils: Historical and scientific considerations. **Journal of Applied Sciences and Environmental Management**, v. 29, n. 2, p. 569-579, 2025.
- UGWU, C.N. *et al.* Biofilms: structure, resistance mechanism, emerging control strategies, and applications. **RSC Pharmaceuticals**, v. 2, p. 1376-1407, 2025.
- VILLASMIL, M.L. *et al.* An *Erg11* lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase-*Arv1* complex is required for *Candida albicans* virulence. **PLoS One**, v. 15, n. 7, p. e0235746, 2020.
- VALERIANO, F.R. *et al.* Use of medicinal plants in the Quilombola do Veloso community, belonging to the municipality of Pitangui –MG. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 12, p. 100701-100718, 2020.
- VITALE, R.G. Role of antifungal combinations in difficult to treat *Candida* infections. **Journal of Fungi**, v. 7, n. 9, p. 731, 2021.
- VITÁLIS, E. *et al.* *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. **Mycoses**, v. 63, n. 4, p. 352-360, 2020.
- VORA, L.K. *et al.* Essential oils for clinical aromatherapy: A comprehensive review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 330, p. 118180, 2024.
- WAKADE, R.S.; WELLINGTON, M.; KRYSAN, D.J. Temporal dynamics of *Candida albicans* morphogenesis and gene expression reveals distinctions between *in vitro* and *in vivo* filamentation. **Msphere**, v. 9, n. 4, p. e00110-24, 2024.
- WALL, G.; LOPEZ-RIBOT, J.L. Current antimycotics, new prospects, and future approaches to antifungal therapy. **Antibiotics**, v. 9, n. 8, p. 445, 2020.
- WANG, N. *et al.* Structural variation and parallel evolution of apomixis in citrus during domestication and diversification. **National Science Review**, v. 9, n. 10, p. nwac114, 2022.
- WANG, Q. *et al.* Functions of representative terpenoids and their biosynthesis mechanisms in medicinal plants. **Biomolecules**, v. 13, n. 12, p. 1725, 2023.
- WANG, L.L. *et al.* Regulatory role of *Mss11* in *Candida glabrata* virulence: adhesion and biofilm formation. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 13, p. 1321094, 2024.
- WIJESINGHE, G.K. *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. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 115, p. e200349, 2020.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO releases first-ever list of health-threatening fungi.** 2022 Disponível em: 50  
<https://www.who.int/news/item/25-10-2022-who-releases-first-ever-list-of-health-threateningfungi>. Acesso: 17 de janeiro de 2025.

WU, P. *et al.* Chemical composition, antimicrobial and insecticidal activities of essential oils of discarded perfume lemon and leaves (*Citrus limon* (L.) Burm. F.) as possible sources of functional botanical agents. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 679116, 2021.

XIAO, M. *et al.* Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in China: an update from the CHIF-NET study. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 221, p. 139-147, 2020.

YAKUBU, D.D.; KATSA, M.M. Comparative antimicrobial activities of essential oils of *Cymbopogon citratus* (lemon grass) and *Citrus sinensis* (sweet orange) peel against some pathogens. **International Journal of Nature and Science Advance Research**, v. 7, n. 9, p. 136-145, 2025.

ZAHR, S. *et al.* Phytochemistry and biological activities of *Citrus sinensis* and *Citrus limon*: An update. **Journal of Herbal Medicine**, v. 41, p. 100737, 2023.

ZIBAE, E. *et al.* *Citrus* species: A review of traditional uses, phytochemistry and pharmacology. **Current Pharmaceutical Design**, v. 26, n. 1, p. 44-97, 2020.

ZHANG, N. *et al.* *Cananga odorata* essential oil reverses the anxiety induced by 1-(3-chlorophenyl) piperazine through regulating the MAPK pathway and serotonin system in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 219, p. 23-30, 2018.

ZHONG, G.; NICOLOSI, E. *Citrus* origin, diffusion, and economic importance. In: *The Citrus genome*. Cham: Springer International Publishing, v. 1, p. 5-21, 2020.

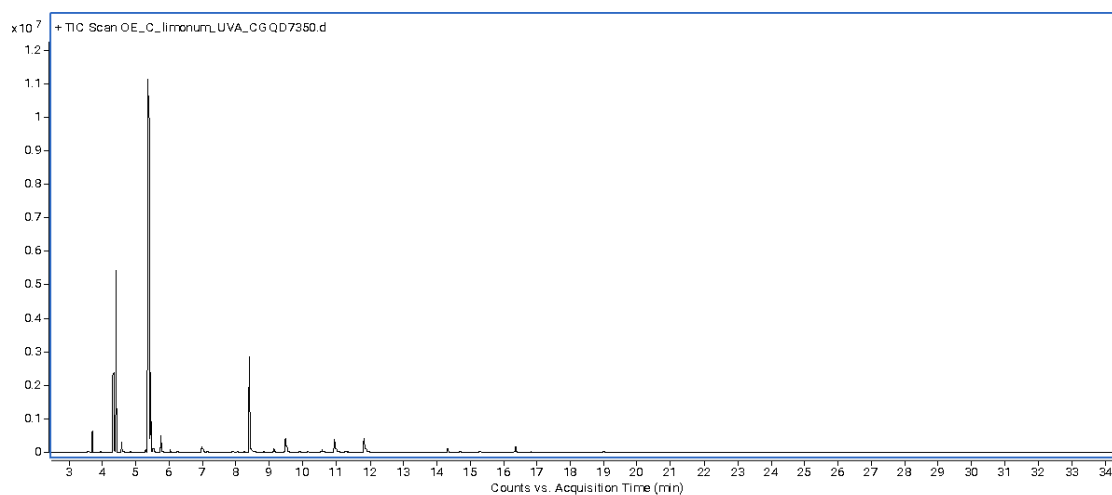
ZHOU, Z.X. *et al.* Antifungal drugs and drug-induced liver injury: a real-world study leveraging the FDA adverse event reporting system database. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, p. 891336, 2022.

ZIMMERMANN, R.C. *et al.* Antifungal activity of essential oils and their combinations against storage fungi. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 30, n. 16, p. 48559-48570, 2023.

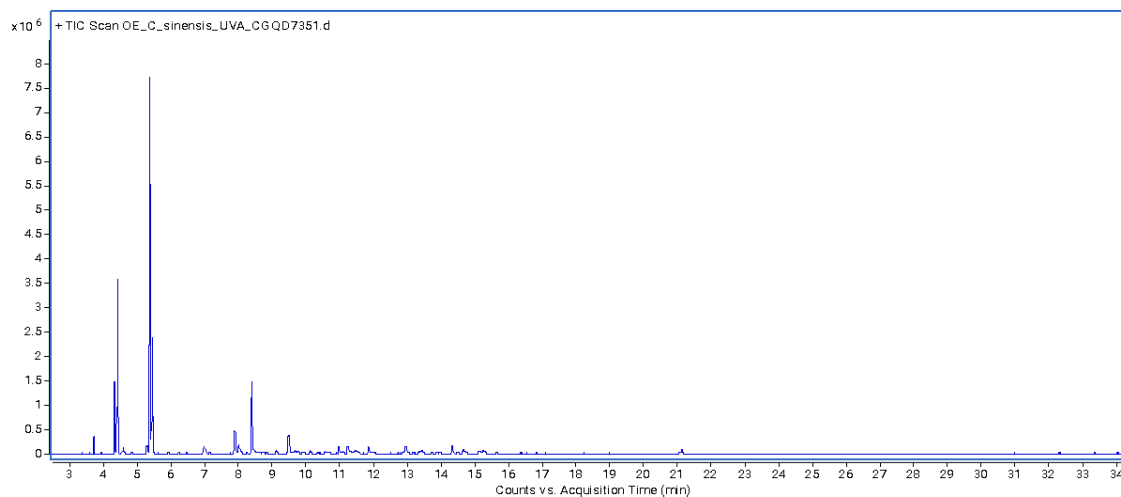
## ANEXOS

### ANEXO A - Gráficos dos perfis cromatográficos dos óleos essenciais

**Gráfico 1.** Perfil cromatográfico do óleo essencial de *C. limon*.



**Gráfico 2.** Perfil cromatográfico do óleo essencial de *C. sinensis*.





UNIVERSIDADE ESTADUAL  
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E HEMOLÍTICA DE PRODUTOS NATURAIS DA REGIÃO CAATINGA (BIOMA)

**Pesquisador:** ANTONIA NADIA BRITO DOS SANTOS

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 74431123.6.0000.5053

**Instituição Proponente:** Universidade Estadual Vale do Acaraú - UVA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.662.155

#### Apresentação do Projeto:

A pesquisa é de caráter quantitativo. Visa fazer análise in vitro de uma pequena amostra do sangue humano quanto a toxicidade do óleo essencial de *C. sativum* (coentro). A CL50 (concentração letal) será calculada utilizando no graph prism, bem como os gráficos apresentando a porcentagem de atividade hemolítica encontrada para os óleos essenciais

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- Investigar a constituição química, atividade antimicrobiana e a citotoxicidade de óleos essenciais de plantas da caatinga contra microorganismos patógenos.

Objetivo Secundário:

- Coletar, extrair e realizar a caracterização química dos óleos essenciais;
- Avaliar a atividade antimicrobiana;
- Determinar a citotoxicidade dos óleos essenciais em eritrócitos humanos.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Há uma boa discussão relacionada aos possíveis riscos e benefícios envolvidos no desenvolvimento da pesquisa

**Endereço:** Av Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 150

**Bairro:** Derby

**CEP:** 62.041-040

**UF:** CE

**Município:** SOBRAL

**Telefone:** (88)3677-4255

**Fax:** (88)3677-4242

**E-mail:** cep\_uva@uvanet.br



Continuação do Parecer: 6.662.155

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa importante quanto ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos para uso médico/farmacêutico.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados

**Recomendações:**

Não se aplicam

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não se aplicam

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado por este comitê.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_2215134.pdf	08/11/2023 16:55:29		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	08/11/2023 16:54:17	ANTONIA NADIA BRITO DOS SANTOS	Aceito
Outros	LATTES.pdf	19/09/2023 19:32:27	ANTONIA NADIA BRITO DOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	COMPROMISSO.docx	19/09/2023 19:31:39	ANTONIA NADIA BRITO DOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Anuencia.pdf	19/09/2023 19:29:31	ANTONIA NADIA BRITO DOS SANTOS	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	DOCPROJETO2.pdf	19/09/2023 19:29:06	ANTONIA NADIA BRITO DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	19/09/2023 19:27:35	ANTONIA NADIA BRITO DOS	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Endereço:** Av Comandante Maurocélvio Rocha Ponte, 150  
**Bairro:** Derby **CEP:** 62.041-040  
**UF:** CE **Município:** SOBRAL  
**Telefone:** (88)3677-4255 **Fax:** (88)3677-4242 **E-mail:** cep\_uva@uvanet.br



UNIVERSIDADE ESTADUAL  
VALE DO ACARAÚ - UVA/CE



Continuação do Parecer: 6.662.155

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SOBRAL, 21 de Fevereiro de 2024

---

**Assinado por:**  
**Eroteíde Leite de Pinho**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Av Comandante Maurocéllo Rocha Ponte, 150

**Bairro:** Derby

**CEP:** 62.041-040

**UF:** CE

**Município:** SOBRAL

**Telefone:** (88)3677-4255

**Fax:** (88)3677-4242

**E-mail:** cep\_uva@uvanet.br



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Yuanwei Zhang,  
Nanjing Normal University, China

## REVIEWED BY

Kássia Jéssica Galdino Silva,  
Université de Nantes, France

## \*CORRESPONDENCE

Maria Alyce Albuquerque Fernandes  
✉ [alycealbuquerque55@gmail.com](mailto:alycealbuquerque55@gmail.com)

RECEIVED 12 August 2025

ACCEPTED 18 September 2025

PUBLISHED 15 October 2025







## CITATION

Fernandes MAA, Aguiar FLLd, Coutinho MGS, Brito EHSd, Coelho CGV and Fontenelle RODs (2025) Changes in nomenclature, virulence factors, and antifungal resistance of the genus *Candida*. *Front. Fungal Biol.* 6:1677892. doi: 10.3389/ffunb.2025.1677892

## COPYRIGHT

© 2025 Fernandes, Aguiar, Coutinho, Brito, Coelho and Fontenelle. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

# Changes in nomenclature, virulence factors, and antifungal resistance of the genus *Candida*

Maria Alyce Albuquerque Fernandes <sup>1,2\*</sup>,  
Francisca Lidianne Linhares de Aguiar <sup>2</sup>,  
Maria Gleiciane Soares Coutinho <sup>2</sup>,  
Erika Helena Salles de Brito <sup>3</sup>,  
Camila Gomes Virginio Coelho <sup>4</sup>  
and Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle <sup>2</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Health Sciences, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil,

<sup>2</sup>Microbiology Laboratory (LABMIC), Vale do Acaraú State University, Sobral, Ceará, Brazil, <sup>3</sup>Institute of Health Sciences, University for International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, Redenção, Ceará, Brazil, <sup>4</sup>Faculty of Medicine, Federal University of Ceará, Sobral, Ceará, Brazil

Some *Candida* species of clinical interest have undergone recent nomenclature changes. These yeasts have a high capacity to adhere to and infect host tissues, driven by their virulence factors, as well as by the incidence of antifungal resistance. This review aimed to analyze the taxonomic changes of the main species of clinical interest within the *Candida* genus, considering the clinical implications of their virulence factors and the main mechanisms of antifungal resistance. The research results allowed us to understand that the updated nomenclature of *Candida* species is essential to maintain the criteria that define a genus, organizing the species according to their phylogenetic and evolutionary characteristics. Understanding the virulence factors and resistance mechanisms of the different species of clinical interest helps us understand how infections are initiated and established, as well as how these same species behave to neutralize the action of antifungals. Therefore, integrating knowledge of taxonomy, virulence, and resistance profiles is crucial for effective strategies to control and treat fungal infections.

## KEYWORDS

*Candida* spp., taxonomic changes, virulence, resistance mechanisms, antifungals

## Introduction

According to taxonomy, fungi are classified based on their phylogenetic characteristics, grouping organisms that share similar evolutionary traits. However, due to the complexity of fungi, taxonomic classification is subject to modifications over time to meet the criteria that define a genus. Some of the main *Candida* species have undergone changes in nomenclature,

being renamed, subdivided within species, and reallocated into new clades (Kidd et al., 2023; Takashima and Sugita, 2022).

Yeasts of the genus *Candida* are unicellular microorganisms with spherical or oval shapes that live in the environment or are commonly part of the human microbiota, where they can be opportunistic pathogens. Some species can alter their morphology to a filamentous form, which is essential for adhesion and invasion of host cells (Lim et al., 2021; Pappas et al., 2018). This ability to perform morphological adaptations is one of the virulence factors presented by the genus, which favors the survival of the species in specific environments while facilitating superficial and invasive infections (Pappas et al., 2018).

*Candida* spp. are gaining more attention due to their ability to infect hosts and the high incidence of hospital-acquired invasive infections. They are recognized as a major cause of morbidity and mortality, stemming from their virulence factors that contribute to decreasing or nullifying the effect of antifungals (Pappas et al., 2016, Pappas et al., 2018). According to Baptista et al. (2020), approximately 80% of fungal infections reported in tertiary hospitals are attributed to yeast infections of the *Candida* genus.

Virulence factors not only increase the pathogenicity of *Candida* spp. but may also contribute to the antifungal resistance mechanisms developed by yeasts, allowing them to evade drug action. Antifungal resistance can be intrinsic or acquired, with reports of *Candida* spp. resistance to standard antifungals recurring (Czajka et al., 2023; Pappas et al., 2018; Thanyarisung et al., 2023). Among the main antifungal resistance mechanisms presented by the *Candida* genus are genetic and enzymatic modifications, activation of efflux pumps, and those presented by biofilms (Miron-Ocampo et al., 2023; Nett and Andes, 2020). In view of the above, this review work aimed to analyze the taxonomic changes of the main species of clinical interest of the *Candida* genus, considering the clinical implications of their virulence factors and the main mechanisms of resistance to antifungals.

## Changes in *Candida* spp. nomenclature

According to Kidd et al. (2023), over the past decade, fungal nomenclature has undergone significant transformations. This is due to advances in molecular technologies in taxonomy, diagnostics, and epidemiology, all aimed at meeting the criteria for defining a genus, such as monophyly, the range of species within a genus, and shared evolutionary and phylogenetic characteristics. Effective January 1, 2013, the practice of using different names for the teleomorph (sexual) and anamorph (asexual) states of fungi was prohibited. Therefore, mycologists must choose a single name from among the many that often already exist for the same species (Borman and Johnson, 2021).

The group of fungi that has undergone the most recent reclassifications and is causing the greatest concern among physicians and medical laboratories are the species of the genus *Candida* (Kidd et al., 2023). The genus *Candida* belongs to the phylum Ascomycota, class Saccharomycetes, and family

Debaryomycetaceae. Multigene phylogenetic analyses suggest that the species of this genus can be grouped into more than 10 distinct clades, with occasional name changes and intraspecies subdivisions (Takashima and Sugita, 2022).

Among the species of clinical interest that have undergone reclassification are *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida guilliermondii*, and *Candida lusitanae*, which are now named *Nakaseomyces glabrata* (*Nakaseomyces*), *Pichia kudriavzevii* (*Pichiaceae*), *Meyerozyma guilliermondii* (*Debaryomycetaceae*), and *Clavispora lusitanae* (*Metschnikowiaceae*), respectively (Kidd et al., 2023; Takashima and Sugita, 2022). *Candida parapsilosis* has also undergone recent changes, remaining in the same clade, *Lodderomyces*, and has been subdivided into three: *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, and *C. metapsilosis*, also known as the *Candida parapsilosis* complex. The three species were organized as a single species for a long time (Takashima and Sugita, 2022; Govrins and Lass-Flörl, 2024).

The species *C. albicans*, *C. parapsilosis*, and *C. tropicalis*, which belong to the *Lodderomyces* clade, one of the largest clades with proven monophyly, retained the name *Candida* (Kidd et al., 2023; Stavrou et al., 2019; Takashima and Sugita, 2022). *Candida auris*, a multiresistant species, despite being part of the *Metschnikovia* clade, retained the same name (Kidd et al., 2023). New changes were made, and *C. auris* is now part of *Candidozyma* with the new nomenclature of *Candidozyma auris* (Liu et al., 2024).

## Main virulence factors

### Adhesion

Adhesion to host cells represents a critical step in the establishment of *Candida* spp. infections and is considered one of the first and most important virulence factors of these opportunistic yeasts. This process is mediated by specialized proteins called adhesins, which are located on the fungal cell surface and facilitate attachment to biotic and abiotic substrates (Nobile and Johnson, 2015; Alim et al., 2018; Wall et al., 2019). An important family of adhesins are the *Als* (Agglutinin-like sequence) proteins, particularly *Als1*, *Als3*, and *Als5*, which have high binding affinity for extracellular matrix components such as fibronectin, laminin, and collagen, favoring adhesion to epithelial and endothelial cells. *Als* expression is regulated by environmental factors and the morphological state of the cell, being intensified during the transition to the filamentous form (Lombardi et al., 2019; Oh et al., 2021; Pokhrel et al., 2022; Bing et al., 2023).

*C. albicans* also contains adhesins of the *Hwp* (Hyphal wall protein) family, which are associated with the formation of true hyphae. The *Hwp1* protein binds to host cells, enabling the formation of covalent bonds between the fungus and epithelial surface proteins. This interaction is highly stable and confers adhesion that is resistant to fluid mechanics and the local immune response. It is primarily expressed under conditions that favor filamentous growth, such as the presence of serum and neutral pH, commonly found in host tissues during the infection phase

(Nobile and Johnson, 2015; Pokhrel et al., 2022; Wooten et al., 2021).

*N. glabrata*, which does not form a filamentous structure, presents a distinct pathogenic profile. The adhesion process is mediated by a different family of adhesins, the EPA (Epithelial adhesins) (Valotteau et al., 2019). EPA1, EPA6, and EPA7 are primarily responsible for adhesion to human epithelial cells and vascular endothelium. EPA1-mediated adhesion occurs through the recognition of specific glycans on the surface of host cells, functioning as a highly specific ligand (López-Fuentes et al., 2018; Yu et al., 2018; Hassan et al., 2021).

## Hydrolytic enzymes

The enzymes most frequently associated with the pathogenicity of *Candida* spp. are proteinases (SAPs), which act on albumin, the extracellular matrix, and host immunoglobulins. These enzymes are important in the process of adhesion to substrates, helping *Candida* species initiate the infectious process in host cells. They also have the unique characteristic of favoring the formation of pseudohyphae and hyphae, which are essential structures for tissue invasion (Czechowicz et al., 2022; Silva-Rocha et al., 2015).

Phospholipases, which break the ester bonds of phospholipids, facilitating yeast invasion. These enzymes are found on the surface of yeast and in germ tubes, playing a crucial role in the establishment of infection by degrading the phospholipid membrane of host cells. This degradation results in altered cellular characteristics, promoting greater adhesion of yeast to epithelial cells and medical devices, such as catheters and prostheses (Lim et al., 2021; Mroczynska and Brillowska-Dąbrowska, 2021; Puello et al., 2023).

Lipase, which catalyzes the hydrolysis of triacylglycerols, and hemolysins are used by *Candida* species to degrade hemoglobin, promoting erythrocyte lysis, releasing iron, an essential nutrient for the growth and maintenance of fungal cells, and contributing to the survival of the pathogen in nutrient-limited environments (Lim et al., 2021; Mroczynska and Brillowska-Dąbrowska, 2021; Nouraei et al., 2020).

## Polymorphism

Morphological change is a key process in the transition of most *Candida* spp. from commensal to pathogenic, where the filamentous form is essential for invasion into host cells and medical devices. Among the species that can change their morphology from yeast to pseudohyphae and true hyphae are *C. albicans* and *C. tropicalis*, but to a lesser extent, thus being polymorphic species (Czechowicz et al., 2022; Talapko et al., 2021; Wu et al., 2016). *C. albicans* has the ability to form structures called germ tubes, which are young true hyphae that form when in contact with host blood cells, providing greater adhesion to substrates (Jung et al., 2020; Trovato et al., 2020). The only other species known to also have the ability to form a germ

tube is *C. dubliniensis* (Navarathna et al., 2016; Sampath et al., 2017).

*P. kudriavzevii*, *C. parapsilosis*, and *C. auris* can produce pseudohyphae and are considered dimorphic species (Czechowicz et al., 2022; Du et al., 2020; Pitarch et al., 2018). *N. glabrata* develops only in its yeast form (blastoconidia), which is also its pathogenic morphology (Czechowicz et al., 2022; Pitarch et al., 2018). The absence of morphological change directly influences its clinical behavior and survival strategies in the host. The absence of filamentous forms limits its direct invasive capacity in tissues compared to other *Candida* species. However, *N. glabrata* compensates for this limitation with increased adhesion capacity to surfaces and formation of more resistant biofilms, factors that make eradication of the infection difficult (López-Fuentes et al., 2018; Olson et al., 2018; Yu et al., 2018; Frías-De-León et al., 2021).

## Biofilm

Biofilms are highly organized biological communities where *Candida* spp. cells cluster together to form coordinated and functional structures. The cells can be mixed, composed of yeast, hyphae, and pseudohyphae, or solely yeast-like cells, such as the *N. glabrata* biofilm. They are immersed in a self-secreted extracellular matrix composed of proteins, carbohydrates, lipids, and DNA, establishing a complex three-dimensional structure that favors the entry of nutrients, the removal of waste, and the formation of microniches within the biofilm (Alim et al., 2018; Ghannoum et al., 2015; Silva et al., 2017; Wall et al., 2019).

These structures are regulated by a communication system called quorum sensing, where the cells of the forming biofilm communicate through lipid signals that control characteristics such as survival, pathogenicity factors, virulence, and behaviors in response to environmental conditions (Alim et al., 2018; Atriwal et al., 2021; Wall et al., 2019). Their formation is regulated by molecular processes in four distinct phases. Initially, yeast cells adhere to a surface, forming a base for the biofilm; over time, the cells proliferate and may develop filamentous structures, contributing to biofilm stability. During the maturation phase, the biofilm thickens due to the growth of the extracellular matrix, and its organization becomes three-dimensional. Eventually, dispersion occurs, in which cells detach from the biofilm and spread to other locations (Alim et al., 2018; Wall et al., 2019; Atriwal et al., 2021).

*Candida* species have a remarkable ability to form biofilms and are frequently found on hospital devices, dentures, prostheses, and especially catheters. On catheters, biofilms can develop intra and extraluminal adhesions (Alim et al., 2018; Atriwal et al., 2021; Silva et al., 2017; Wall et al., 2019). Biofilm formation on medical devices poses a significant clinical challenge, especially in hospital settings, conferring resistance to antifungals and hindering the immune system's action, making infections persistent and difficult to treat (Thomaz et al., 2018; Jung et al., 2020; Melo et al., 2023).

Biofilm formation is one of the main reasons for antifungal treatment failure, as biofilm cells are protected from environmental stress and host defenses (Alim et al., 2018; Wall et al., 2019). Biofilms

are difficult to treat due to their physical and genetic properties, presenting three main resistance mechanisms: the extracellular matrix that protects the cells, hindering the action of host defense cells and antifungal therapy; persister cells that acquire tolerance due to prolonged exposure to antifungals; and the activation of efflux pumps that occur during the primary stage of biofilm formation, adhesion (Nobile and Johnson, 2015; Silva et al., 2017; Atriwal et al., 2021; Kaur and Nobile, 2023).

## Main mechanisms of planktonic cell resistance

The three main classes of antifungals are azoles, polyenes, and echinocandins, which have distinct targets of action. Azoles inhibit the fungal enzyme lanosterol 14- $\alpha$ -demethylase, encoded by the cytochrome P450 gene *ERG11*, which is the enzyme involved in ergosterol synthesis (Chang et al., 2017; Salazar et al., 2020). Among polyenes, the most commonly used drug is Amphotericin B; its mechanism of action is fungal cell death through the formation of pores in ergosterol-containing membranes (Chang et al., 2017; Salazar et al., 2020). And echinocandins act by inhibiting  $\beta$ -1,3-glucan synthase, an enzyme complex that acts in the synthesis of the fungal cell wall (Chang et al., 2017).

The resistance mechanisms developed by *Candida* species to antifungal classes may occur due to mutations in the *ERG* genes, reducing the effectiveness of azoles, or by amino acid substitutions near the 14- $\alpha$ -demethylase binding site and by activation of efflux pumps (Campoy and Adrio, 2017; Houř et al., 2020; Salazar et al., 2020). Resistance to polyenes is considered very rare (Chang et al., 2017; Salazar et al., 2020), but the mechanisms involved are alterations that result from mutations in the *ERG3* genes (Chang et al., 2017; Houř et al., 2020; Salazar et al., 2020). The mechanisms of resistance to echinocandins are mutations in the *FKS1* and *FKS2* genes that result in amino acid substitutions in *Hs1* and *Hs2*, which are called “hotspots”, which are regions of the *FKS* genes that act in the synthesis of the fungal cell wall (Chang et al., 2017; Daneshnia et al., 2023).

## Discussion

According to Gabaldón et al (2016), *Candida* species are distributed throughout the Saccharomycotina phylogeny, present in most clades, and generally mixed with species from other genera, highlighting polyphyly, which differs from the criteria for genus definition. To adhere to taxonomic principles, new redefinitions are necessary so that species are organized within clades that suit their evolutionary and phylogenetic characteristics.

Adhesion mechanisms have important clinical implications that facilitate infection persistence. Their action in conjunction with hydrolytic enzymes contributes to evading the host's immune response by modifying the local microenvironment (Talapko et al., 2021; Branco et al., 2023). Morphological transition is a key factor in the pathogenicity of most *Candida* species of clinical interest, associated with greater antifungal resistance, especially in biofilm infections. Therefore, they represent potential targets for

new therapeutic strategies aimed at returning to the commensal stage and preventing biofilm formation.

Biofilm characteristics can vary according to the *Candida* species, presenting different responses to available therapies. In the study by Alves et al. (2023), the biofilm formed by isolates obtained from children had higher biomass and a matrix composition richer in polysaccharides than that isolated from adults. *P. kudriavzevii* was the most frequently isolated species in the children's oral microbiota, and strains of this species also had higher biofilm biomass. The most frequently isolated species in adults was *C. albicans*, but it had a lower biofilm-forming capacity. The susceptibility of *Candida* spp. to antimicrobials in the biofilm of strains from the children's group was directly associated with the amount of protein/polysaccharides, whereas no such relationship was observed in biofilms of strains from the adult group.

Fungal infections caused by planktonic cells intensify with biofilm formation, especially on medical devices, requiring differentiated therapeutic approaches. The activation and upregulation of efflux pumps in planktonic cells is triggered by the presence of antifungal drugs. In biofilm cells, this upregulation occurs naturally from the first hours of adhesion and persists throughout biofilm development, regardless of the presence of antifungal drugs (Nobile and Johnson, 2015; Kaur and Nobile, 2023). The distinct ways in which cells activate this mechanism help us understand the molecular processes involved in *Candida* spp. resistance due to efflux overexpression, demonstrating the essential need to develop clinical strategies that can overcome this barrier, such as the use of specific efflux inhibitors in combination with traditional antifungals.

Advances in molecular phylogeny and fungal taxonomy have reshaped our understanding of *Candida* species, leading to more than just name changes but also promoting the organization of species according to their shared phylogenetic and evolutionary characteristics. These changes reflect taxonomic advances, which, while not directly reflected in the virulence profiles of *Candida* spp., are important for understanding the pathogenic profiles and antifungal sensitivity/resistance across the various clades that comprise the *Candida* genus. The sophisticated virulence factors that favor immune evasion and prolong infections caused by *Candida* spp. highlight the importance of continuous updating in the medical and microbiological fields, revealing how evolutionary knowledge directly impacts the control of fungal infections, improving diagnosis, and tailoring therapies to the profiles of the causative species, aiming to reduce morbidity and mortality associated with fungal infections caused by these species.

## Author contributions

MF: Writing – original draft, Investigation, Writing – review & editing, Methodology, Data curation. FA: Supervision, Validation, Writing – review & editing, Visualization. MC: Writing – review & editing, Resources. EB: Writing – review & editing, Visualization. CC: Visualization, Writing – review & editing. RF: 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. M.A.A.F. 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 M.G.S.C. is thankful to the State Funding Agency (FUNCAP), grant number FPD-0213-00362.01.00/23.

## 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

- Alim, D., Sircaik, S., and Panwar, S. L. (2018). The significance of lipids to biofilm formation in *Candida albicans*: An emerging perspective. *J. Fungi* 4, 140. doi: 10.3390/jof4040140
- Alves, A. M. C. V., Lopes, B. O., Leite, A. C. R. D. M., Cruz, G. S., Brito, É.H.S.D., Lima, L. F. D., et al. (2023). Characterization of oral *Candida* spp. Biofilms in children and adults carriers from eastern europe and south america. *Antibiotics* 12, 797. doi: 10.3390/antibiotics12050797
- Atriwal, T., Azeem, K., Husain, F. M., Hussain, A., Khan, M. N., Alajmi, M. F., et al. (2021). Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. *Front. Microbiol.* 12. doi: 10.3389/fmicb.2021.638609
- Baptista, K. C. C., Nascimento, K. F. do, Souza, S. J. P. de, Burci, L. M., Silva, F. B., et al. (2020). Infecções hospitalares por *Candida* sp. em pacientes internados em UTI. *Rev. Gestão Saúde* 22, 66–81. doi: 10.17648/1984-8153-rgs-v2n22-6
- Bing, J., Guan, Z., Zheng, T., Zhang, Z., Fan, S., Ennis, C. L., et al. (2023). Clinical isolates of *Candida auris* with enhanced adherence and biofilm formation due to genomic amplification of ALS4. *PLoS Pathog.* 19, e1011239. doi: 10.1371/journal.ppat.1011239
- Borman, A. M., and Johnson, E. M. (2021). Name changes for fungi of medical importance, 2018 to 2019. *J. Clin. Microbiol.* 59, 10.1128/jcm.01811-20. doi: 10.1128/jcm.01811-20
- Branco, J., Miranda, I. M., and Rodrigues, A. G. (2023). *Candida parapsilosis* virulence and antifungal resistance mechanisms: a comprehensive review of key determinants. *J. Fungi* 9, 80. doi: 10.3390/jof9010080
- Campoy, S., and Adrio, J. L. (2017). Antifungals. *Biochem. Pharmacol.* 133, 86–96. doi: 10.1016/j.bcp.2016.11.019
- Chang, Y. L., Yu, S. J., Heitman, J., Wellington, M., Chen, Y. L., et al. (2017). New facets of antifungal therapy. *Virulence* 8, 222–236. doi: 10.1080/21505594.2016.1257457
- Czajka, K. M., Venkataraman, K., Brabant-Kirwan, D., Santi, S. A., Verschoor, C., Appanna, V. D., et al. (2023). Molecular mechanisms associated with antifungal resistance in pathogenic *Candida* species. *Cells* 12, 2655. doi: 10.3390/cells12222655
- Czechowicz, P., Nowicka, J., and Gościński, G. (2022). Virulence factors of *Candida* spp. and host immune response important in the pathogenesis of vulvovaginal candidiasis. *Int. J. Mol. Sci.* 23, 5895. doi: 10.3390/ijms23115895
- Daneshnia, F., Almeida Júnior, J. N. de, Arastehfar, A., Lombardi, L., Shor, E., Moreno, L., et al. (2023). *Candida parapsilosis* isolates carrying mutations outside FKS1 hotspot regions confer high echinocandin tolerance and facilitate the development of echinocandin resistance. *Int. J. Antimicrob. Agents* 62, 106831. doi: 10.1080/22221751.2022.2117093
- Du, H., Bing, J., Hu, T., Ennis, C. L., Nobile, C. J., and Huang, G. (2020). *Candida auris*: Epidemiology, biology, antifungal resistance, and virulence. *PLoS Pathog.* 16, 1–18. doi: 10.1371/journal.ppat.1008921
- Frias-De-León, M. G., Hernández-Castro, R., Conde-Cuevas, E., García-Coronel, I. H., Vázquez-Aceituno, V. A., Soriano-Ursúa, M. A., et al. (2021). *Candida glabrata*

## Generative AI statement

The author(s) declare that no Generative AI was used in the creation of this manuscript.

Any alternative text (alt text) provided alongside figures in this article has been generated by Frontiers with the support of artificial intelligence and reasonable efforts have been made to ensure accuracy, including review by the authors wherever possible. If you identify any issues, please contact us.

## Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

- antifungal resistance and virulence factors, a perfect pathogenic combination. *Pharmaceutics* 13, 1529. doi: 10.3390/pharmaceutics13101529
- Gabaldón, T., Naranjo-Ortiz, M. A., and Marcet-Houben, M. (2016). Evolutionary genomics of yeast pathogens in the Saccharomycotina. *FEMS Yeast Res.* 16, fow064. doi: 10.1093/femsyr/fow064
- Ghannoum, M., Roilides, E., Katragkou, A., Petraitis, V., Walsh, T. J., et al. (2015). The role of echinocandins in *Candida* biofilm-related vascular catheter infections: *in vitro* and *in vivo* model systems. *Clin. Infect. Dis.* 61, 618–621. doi: 10.1093/cid/civ815
- Govrins, M., and Lass-Flörl, C. (2024). *Candida parapsilosis* complex in the clinical setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 22, 46–59. doi: 10.1038/s41579-023-00961-8
- Hassan, Y., Chew, S. Y., and Than, L. T. L. (2021). *Candida glabrata*: pathogenicity and resistance mechanisms for adaptation and survival. *J. Fungi* 7, 667. doi: 10.3390/jof7080667
- Houš, J., Spížek, J., and Havlíček, V. (2020). Antifungal drugs. *Metabolites* 10, 106. doi: 10.3390/metabo10030106
- Jung, P., Mischo, C. E., Gunaratnam, G., Spengler, C., Becker, S. L., Hube, B., et al. (2020). *Candida albicans* adhesion to central venous catheters: Impact of blood plasma-driven germ tube formation and pathogen-derived adhesins. *Virulence* 11, 1453–1465. doi: 10.1080/21505594.2020.1836902
- Kaur, J., and Nobile, C. J. (2023). Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida* biofilms. *Curr. Opin. Microbiol.* 71, e102237. doi: 10.1080/21505594.2020.1836902
- Kidd, S. E., Abdolrasouli, A., and Hagen, F. (2023). Fungal nomenclature: managing change is the name of the game. *Open Forum Infectious Dis.* 10, ofac559. doi: 10.1093/ofid/ofac559
- Lim, S. J., Ali, M. S. M., Sabri, S., Noor, N. D. M., Salleh, A. B., Oslan, S. N., et al. (2021). Opportunistic yeast pathogen *Candida* spp.: Secreted and membrane-bound virulence factors. *Med. Mycology* 59, 1127–1144. doi: 10.1093/mmy/mbab053
- Liu, F., Hu, Z. D., Zhao, X. M., Zhao, W. N., Feng, Z. X., Yurkov, A., et al. (2024). Phylogenomic analysis of the *Candida auris*-*Candida haemuli* clade and related taxa in the Metschnikowiaceae, and proposal of thirteen new genera, fifty-five new combinations and nine new species. *Persoonia-Molecular Phylogeny Evol. Fungi* 52, 22–43. doi: 10.3767/persoonia.2024.52.02
- Lombardi, L., Zoppo, M., Rizzato, C., Bottai, D., Hernandez, A. G., Hoyer, L. L., et al. (2019). Characterization of the *Candida orthopsilosis* agglutinin-like sequence (ALS) genes. *PLoS One* 14, e0215912. doi: 10.1371/journal.pone.0215912
- López-Fuentes, E., Gutiérrez-Escobedo, G., Timmermans, B., Van Dijk, P., De Las Peñas, A., Castaño, I., et al. (2018). *Candida glabrata*'s genome plasticity confers a unique pattern of expressed cell wall proteins. *J. Fungi* 4, 67. doi: 10.3390/jof4020067
- Melo, C. C. D., Sousa, B. R. D., Costa, G. L. D., Oliveira, M. M. E., Lima-Neto, R. G. D., et al. (2023). Colonized patients by *Candida auris*: Third and largest outbreak in Brazil and impact of biofilm formation. *Front. Cell. Infection Microbiol.* 13. doi: 10.3389/fcimb.2023.1033707
- Miron-Ocampo, A., Beattie, S. R., Guin, S., Conway, T., Meyers, M. J., Moye-Rowley, W. S., et al. (2023). CWHM-974 is a fluphenazine derivative with improved antifungal

- activity against *Candida albicans* due to reduced susceptibility to multidrug transporter-mediated resistance mechanisms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 67, e00567–e00523. doi: 10.1128/aac.00567-23
- Mroczyńska, M., and Brillowska-Dąbrowska, A. (2021). Virulence of clinical *Candida* isolates. *Pathogens* 10, 466. doi: 10.3390/pathogens10040466
- Navarathna, D., Pathirana, R. U., Lionakis, M. S., Nickerson, K. W., Roberts, D. D., et al. (2016). *Candida albicans* ISW2 regulates chlamydo-spore suspensor cell formation and virulence *in vivo* in a mouse model of disseminated candidiasis. *PLoS One* 11, e0164449. doi: 10.1371/journal.pone.0164449
- Nett, J. E., and Andes, D. R. (2020). Contributions of the biofilm matrix to *Candida* pathogenesis. *J. Fungi* 6, 21. doi: 10.3390/jof6010021
- Nobile, C. J., and Johnson, A. D. (2015). *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 71–92. doi: 10.1146/annurev-micro-091014-104330
- Nouraei, H., Pakshir, K., ZareShahrabadi, Z., Zomorodian, K., et al. (2020). High detection of virulence factors by *Candida* species isolated from bloodstream of patients with candidemia. *Microbial Pathogenesis* 149, 104574. doi: 10.1016/j.micpath.2020.104574
- Oh, S. H., Isenhower, A., Rodriguez-Bobadilla, R., Smith, B., Jones, J., Hubka, V., et al. (2021). Pursuing advances in DNA sequencing technology to solve a complex genomic jigsaw puzzle: the agglutinin-like sequence (ALS) genes of *Candida tropicalis*. *Front. Microbiol.* 11. doi: 10.3389/fmicb.2020.594531
- Olson, M. L., Jayaraman, A., and Kao, K. C. (2018). Relative abundances of *Candida albicans* and *Candida glabrata* *in vitro* coculture biofilms impact biofilm structure and formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 84, e02769–e02717. doi: 10.1128/AEM.02769-17
- Pappas, P. G., Kauffman, C. A., Andes, D. R., Clancy, C. J., Marr, K. A., Ostrosky-Zeichner, L., et al. (2016). Clinical practice guideline for the management of candidiasis: 2016 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin. Infect. Dis.* 62, 1–50. doi: 10.1093/cid/civ933
- Pappas, P. G., Lionakis, M. S., Arendrup, M. C., Ostrosky-Zeichner, L., Kullberg, B. J., et al. (2018). Invasive candidiasis. *Nat. Rev. Dis. Primers* 4, 1–20. doi: 10.1038/nrdp.2018.26
- Pitarch, A., Nombela, C., and Gil, C. (2018). Diagnosis of invasive candidiasis: from gold standard methods to promising leading-edge technologies. *Curr. Topics Medicinal Chem.* 18, 1375–1392. doi: 10.2174/1568026618666181025093146
- Pokhrel, S., Boonmee, N., Tulyaprawat, O., Pharkjaksu, S., Thaipisutikul, I., Chairatana, P., et al. (2022). Assessment of biofilm formation by *Candida albicans* strains isolated from hemocultures and their role in pathogenesis in the zebrafish model. *J. Fungi* 8, 1014. doi: 10.3390/jof8101014
- Puello, M., Young, G., and Suárez, P. (2023). Actividad de fosfolipasas y proteasas en aislamientos de especies de *Candida* colonizadoras y causantes de vulvovaginitis en mujeres gestantes. *Biomedica* 43, 89–96. doi: 10.7705/biomedica.6759
- Salazar, S. B., Simões, R. S., Pedro, N. A., Pinheiro, M. J., Carvalho, M. F. N. N., and Mira, N. P. (2020). An overview on conventional and non-conventional therapeutic approaches for the treatment of candidiasis and underlying resistance mechanisms in clinical strains. *J. Fungi* 6, 23. doi: 10.3390/jof6010023
- Sampath, A., Weerasekera, M., Dilhari, A., Gunasekara, C., Bulugahapitiya, U., Fernando, N., et al. (2017). Comparison of duplex PCR and phenotypic analysis in differentiating *Candida dubliniensis* from *Candida albicans* from oral samples. *AMB Express* 7, 1–6. doi: 10.1186/s13568-017-0435-9
- Silva-Rocha, W. P., Lemos, V. L. B., Ferreira, M. R. A., Soares, L. A. L., Svidzinski, T. I. E., Milan, E. P., et al. (2015). Effect of the crude extract *Eugenia uniflora* in morphogenesis and secretion of hydrolytic enzymes in *Candida albicans* from the oral cavity of kidney transplant recipients. *Altern. Med.* 15, 1–15. doi: 10.1186/s12906-015-0522-x
- Silva, S., Rodrigues, C. F., Araújo, D., Rodrigues, M. E., Henriques, M., et al. (2017). *Candida* species biofilms' antifungal resistance. *J. Fungi* 3, 8. doi: 10.3390/jof3010008
- Stavrou, A. A., Lackner, M., Lass-Flörl, C., Boekhout, T., et al. (2019). The changing spectrum of Saccharomycotina yeasts causing candidemia: phylogeny mirrors antifungal susceptibility patterns for azole drugs and amphotericin B. *FEMS Yeast Res.* 19, , foz037. doi: 10.1093/femsyr/foz037
- Takashima, M., and Sugita, T. (2022). Taxonomy of pathogenic yeasts *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, and *Trichosporon* current status, future perspectives, and proposal for transfer of six *Candida* species to the genus *Nakaseomyces*. *Med. Mycology J.* 63, 119–132. doi: 10.3314/mmj.22.004
- Talapko, J., Juzbašić, M., Matijević, T., Pustijanac, E., Bekić, S., Kotris, I., et al. (2021). *Candida albicans* - the virulence factors and clinical manifestations of infection. *J. Fungi* 7, 79. doi: 10.3390/jof7020079
- Thanyasisung, P., Satitviboon, W., Howattanapanich, S., Matangkasombut, O., et al. (2023). Antifungal drug resistance in oral *Candida* isolates from HIV-infected and healthy individuals and efficacy of chitosan as an alternative antifungal agent. *Arch. Oral Biol.* 147, 105628. doi: 10.1016/j.archoralbio.2023.105628
- Thomaz, D. Y., Almeida Jr, J. N. D., Lima, G. M. E., Nunes, M. D. O., Camargo, C. H., Grenfell, R. D. C., et al. (2018). An azole-resistant *Candida parapsilosis* outbreak: clonal persistence in the intensive care unit of a Brazilian teaching hospital. *Front. Microbiol.* 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.02997
- Trovato, L., Astuto, M., Castiglione, G., Scalia, G., Oliveri, S., et al. (2020). Diagnostic surveillance by *Candida albicans* germ tube antibody in intensive care unit patients. *J. Microbiology Immunol. Infection* 53, 778–784. doi: 10.1016/j.jmii.2019.02.001
- Valotteau, C., Prystopiuk, V., Cormack, B. P., Dufrière, Y. F., et al. (2019). Atomic force microscopy demonstrates that *Candida glabrata* uses three Epa proteins to mediate adhesion to abiotic surfaces. *MSphere* 4, 10.1128/msphere.00277-19. doi: 10.1128/mSphere.00277-19
- Wall, G., Montelongo-Jauregui, D., Bonifacio, B. V., Lopez-Ribot, J. L., Uppuluri, P., et al. (2019). *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 52, 1–6. doi: 10.1016/j.mib.2019.04.001
- Wooten, D. J., Zaňudo, J. G. T., Murrugarra, D., Perry, A. M., Dongari-Bagtzoglou, A., Laubenbacher, R., et al. (2021). Mathematical modeling of the *Candida albicans* yeast to hyphal transition reveals novel control strategies. *PLoS Comput. Biol.* 17, e1008690. doi: 10.1371/journal.pcbi.1008690
- Wu, Y., Li, Y. H., Yu, S. B., Li, W. G., Liu, X. S., Zhao, L., et al. (2016). A genome-wide transcriptional analysis of yeast-hyphal transition in *Candida tropicalis* by RNASeq. *PLoS One* 11, 1–16. doi: 10.1371/journal.pone.0166645
- Yu, S. J., Chang, Y. L., and Chen, Y. L. (2018). Deletion of ADA2 increases antifungal drug susceptibility and virulence in *Candida glabrata*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy* 62, 10.1128/aac.01924-17. doi: 10.1128/aac.01924-17



**Anticandidal and antibiofilm activity of the essential oils  
from the leaves of *Citrus limon* and *Citrus sinensis***

Journal:	<i>Planta Medica</i>
Manuscript ID	PLAMED-2025-08-0744-OP.R2
Manuscript Type:	Original Papers
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Albuquerque Fernandes, Maria Alyce; Universidade Federal do Ceará, Postgraduate Program in Health Sciences Linhares de Aguiar, Francisca Lidiane; Universidade Estadual Vale do Acaraú, Center for Agricultural and Biological Sciences Lima Rodrigues, Pedro Henrique; Universidade Federal do Ceará, Postgraduate Program in Health Sciences Lima Torres Martins, Marcílio Dimateus; Universidade Federal do Ceará, Postgraduate Program in Biotechnology Bezerra de Souza, Elnatan; Universidade Estadual Vale do Acaraú, Center for Agricultural and Biological Sciences Parcelli Costa do Vale, Jean; Universidade Estadual Vale do Acaraú, Center for Exact Sciences and Technology Rodrigues, Tigressa Helena; Universidade Estadual Vale do Acaraú, Center for Exact Sciences and Technology Salles de Brito, Erika Helena; Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, Institute of Health Sciences Fontenelle, Raquel Oliveira; Universidade Estadual Vale do Acaraú, Center for Agricultural and Biological Sciences
Keywords:	<i>Candida albicans</i> , virulence, antifungal activity, <i>Citrus limon</i> , <i>Citrus sinensis</i> , Rutaceae

SCHOLARONE™  
Manuscripts

1  
2  
3  
4 **Anticandidal and antibiofilm activity of the essential oils from the leaves of *Citrus limon***  
5 **and *Citrus sinensis***  
6  
7  
8  
9

10  
11 Maria Alyce Albuquerque Fernandes<sup>1</sup>; Francisca Lidiane Linhares Aguiar<sup>2</sup>; Pedro Henrique  
12 Lima Rodrigues<sup>1</sup>; Marcílio Dimateus Lima Torres Martins<sup>3</sup>; Elnatan Bezerra de Souza<sup>2</sup>; Jean  
13 Parcelli Costa do Vale<sup>4</sup>; Tigressa Helena Soares Rodrigues<sup>4</sup>; Erika Helena Salles de Brito<sup>5</sup>;  
14 Raquel Oliveira dos Santos Fontenelle<sup>2</sup>  
15  
16  
17  
18  
19

20  
21  
22  
23 <sup>1</sup> Master's student of Postgraduate Program in Health Sciences, Medical School, Federal  
24 University of Ceará, Brazil;

25  
26  
27 <sup>2</sup> Center for Agricultural and Biological Sciences, Vale do Acaraú State University, Brazil;

28  
29  
30  
31 <sup>3</sup> Master's student of Postgraduate Program in Biotechnology, Medical School, Federal  
32 University of Ceará, Brazil;

33  
34  
35 <sup>4</sup> Center for Exact Sciences and Technology, Vale do Acaraú State University, Brazil;

36  
37  
38 <sup>5</sup> Institute of Health Sciences, International Integration of Afro-Brazilian Lusophony, Brazil.

39  
40  
41 \* Correspondence author: Maria Alyce Albuquerque Fernandes, Graduated in Biological  
42 Sciences. Postgraduated Program in Health Sciences, Federal University of Ceará, Av. Cmte.  
43 Maurocéllo Rocha Pontes, 100 - Jocely Dantas de Andrade Torres, Sobral, Ceará, Brazil. Tel:  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
+5588994471559. E-mail: alycealbuquerque55@gmail.com

52  
53 **ABSTRACT**

54  
55 *Candida albicans* is an opportunistic pathogen whose virulence factors, such as polymorphism  
56 and biofilm formation, facilitate infection. Due to rising antifungal resistance, essential oils  
57 (EOs) from *Citrus limon* and *Citrus sinensis* are being investigated for their antimicrobial

1  
2  
3  
4 potential. This study analyzes the chemical composition, antifungal activity against *Candida*  
5  
6 *albicans* in planktonic and biofilm forms, cytotoxicity on human erythrocytes, and  
7  
8 pharmacokinetic properties of *Citrus limon* and *Citrus sinensis* essential oils. The essential oils  
9  
10 were extracted from the leaves by hydrodistillation, and their composition was analyzed by GC-  
11  
12 MS. Antifungal activity was assessed using broth microdilution and time-kill kinetics.  
13  
14 Combined effects were assessed using checkerboard assays, while antibiofilm tests were  
15  
16 evaluated using polystyrene plate assays and microscopy. Hemolytic activity tests were  
17  
18 performed using percentage hemolysis. *C. limon* essential oil had limonene 40.8%,  $\beta$ -pinene  
19  
20 16.5%, citronellal 12.3%, while *C. sinensis* had limonene 36.7%,  $\beta$ -pinene 14.6% and  
21  
22 eucalyptol 10.5% as its main constituents. The MIC was 0.312–1.25 mg/mL, with kill kinetics  
23  
24 of up to 10 h. It showed additive effects for *C. limon*/fluconazole and synergistic effects for *C.*  
25  
26 *sinensis*/fluconazole. It exhibited anti-adhesion and anti-polymorphism effects, inhibiting  
27  
28 biofilm formation. It also exhibited low cytotoxicity, with an  $LC_{50}$  of 14,000  $\mu$ g/mL for *C. limon*  
29  
30 and 13,000  $\mu$ g/mL for *C. sinensis*. ADMET and BOILED-egg pharmacokinetic predictions  
31  
32 indicated safety for systemic use, with caution for topical application of limonene, citronellal,  
33  
34 and eucalyptol. Both EOs exhibited strong anti-*Candida* activity with minimal cytotoxicity. Its  
35  
36 additive/synergistic effects with fluconazole highlight its potential as an alternative or adjuvant  
37  
38 therapy against *C. albicans* infections.  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47

48 **Keywords:** *Candida albicans*; virulence; antifungal activity; *Citrus limon*; *Citrus sinensis*;  
49  
50 Rutaceae.  
51  
52  
53  
54

## 55 Introduction

56  
57 *Candida albicans* is a polymorphic yeast capable of alternating its morphology from  
58  
59 yeast (blastoconidia) to filamentous forms, true hyphae, and pseudohyphae. This morphological  
60

1  
2  
3  
4 change is induced by environmental conditions, such as changes in pH and temperature. The  
5  
6 species colonizes the human microbiota, playing important roles in maintaining the host's  
7  
8 internal balance, but is opportunistic, becoming pathogenic when there is an imbalance in the  
9  
10 host-parasite binomial. The literature describes 15 species of the *Candida* genus as human  
11  
12 pathogens, with *C. albicans* being the most prevalent species among the strains isolated from  
13  
14 patients with candidemia [1,2].  
15  
16

17  
18 The ability of *C. albicans* to cause infections stems from its virulence mechanisms, such  
19  
20 as the ability to form hyphae and pseudohyphae, and the production of proteinase and  
21  
22 phospholipase enzymes, which help fungal cells adhere to host cells and medical devices. This  
23  
24 adhesion ability is another virulence factor. It also possesses the ability to invade host cells and  
25  
26 subsequently form biofilms [3].  
27  
28

29  
30 Biofilms are organized microbial communities formed by a single or multiple species,  
31  
32 attached to biotic or abiotic substrates, surrounded by an extracellular matrix composed of  
33  
34 polysaccharide substances produced by the cells themselves, which protect them from external  
35  
36 stresses. Once mature, biofilms release planktonic cells to initiate new infection sites, thus  
37  
38 hindering drug action and potentially leading to antimicrobial resistance. *C. albicans* biofilms  
39  
40 present cells with hyphal and/or pseudohyphal morphology, increasing their ability to cause  
41  
42 infections by facilitating invasion of host cells [4].  
43  
44

45  
46 Antifungal resistance is multifactorial, being related to different resistance mechanisms  
47  
48 depending on the fungal species and antifungal class, and is classified as intrinsic or acquired.  
49  
50 Intrinsic resistance is a phenotypic characteristic that confers resistance before exposure to the  
51  
52 antifungal, while acquired resistance occurs after exposure to the antifungal, where surviving  
53  
54 microorganisms develop epigenetic alterations, becoming resistant [5,6]. Antifungal treatment  
55  
56 is limited to only four classes of antifungals: azoles, polyenes, echinocandins, and pyrimidine  
57  
58 analogs [5]. Antifungal resistance in *C. albicans* is more common with azole compounds, which  
59  
60

1  
2  
3  
4 are the first-line treatment. One mechanism of resistance to azoles involves mutations in the  
5  
6 *ERG11*, which encodes ergosterol biosynthesis. And the *MDR1*, *CDR1*, and *CDR2* genes that  
7  
8 trigger the activation of efflux pumps [7].  
9

10  
11 Another limiting factor in antifungal treatment is the toxicity of conventional antifungals  
12  
13 to human cells, such as amphotericin B, which presents rare cases of antifungal resistance but  
14  
15 has high nephrotoxicity and hepatotoxicity [6]. Antifungal treatment in general is  
16  
17 hepatocytotoxic due to the similarity of fungal cells to mammalian cells, thus presenting mild  
18  
19 and even more severe effects depending on the dose and duration of treatment [6,8].  
20  
21

22  
23 The search for therapeutic alternatives to treat microbial infections has driven the  
24  
25 exploration of the biological activities of natural products, such as essential oils, with reports in  
26  
27 the literature of broad-spectrum biological activities [9]. *Citrus limon* (L.) Burm. f. and *Citrus*  
28  
29 *sinensis* (L.) Osbeck, belonging to the Rutaceae family, popularly known as Sicilian lemon and  
30  
31 sweet orange, respectively, have been used in folk medicine for centuries to treat a wide range  
32  
33 of health conditions. The essential oil of *C. limon* is used for coughs. The juice is traditionally  
34  
35 used to treat scurvy, sore throat, fever, rheumatism, hypertension, chest pain, the common cold,  
36  
37 and menstrual cramps [10]. *C. sinensis* has been used traditionally to treat ailments like  
38  
39 constipation, cramps, colic, diarrhea, bronchitis, tuberculosis, cough, cold, obesity, menstrual  
40  
41 disorders, angina, hypertension, anxiety, depression, and stress [11].  
42  
43  
44

45  
46 The essential oils of these plants exhibit multiple biological activities, including  
47  
48 antibacterial, antiviral, fungicidal, and antioxidant effects, due to their richness in flavonoids,  
49  
50 volatile compounds, coumarins, and pectins. With limonene described as the major compound  
51  
52 of *Citrus* spp. [12,13]. However, there are records of essential oils with anti-*Candida* activity  
53  
54 from *Citrus sinensis* in which the major compound is sabinene, not limonene [14]. Antibiofilm  
55  
56 activity against *Candida* is associated with both *Citrus delicius* essential oil and limonene  
57  
58  
59  
60

[15,16]. In both cases, an anti-adhesion effect is observed in the initial phase of biofilm formation. Furthermore, limonene also exhibits activity against mature biofilm [16].

Given the problems of resistance and toxicity that reduce success in the treatment of systemic fungal infections, research with essential oils to evaluate their antifungal activities aimed at the virulence factors of the species is important and interesting in the search for new antifungal therapies. This study aimed to analyze the chemical composition and antifungal activity of essential oils from leaves of *Citrus limon* and *Citrus sinensis* against *Candida albicans* in planktonic and biofilm forms. In addition, it was also analyzed the cytotoxic potential against human erythrocytes and its molecular mechanism and pharmacokinetic profile using *in silico* approaches.

## Results and Discussion

*C. limon* essential oil had a yield of 0.49% (v/w) and a density of 0.874 g/mL. Meanwhile, *C. sinensis* essential oil had a yield of 0.51% and a density of 0.795 g/mL. Regarding the visual characteristics of the essential oils, both were clear and slightly yellowish, *C. limon* with a strong aroma characteristic of the species, and *C. sinensis* with a more subtle aroma. Regarding the analysis of the chemical components of the essential oils, limonene was identified as the major compound in both EOs, with 40.81% for *C. limon* and 36.69% for *C. sinensis* (Table 1). The constituents  $\beta$ -pinene, citronellal, eucalyptol, and sabinene are also present in larger quantities in both essential oils, with variations (Table 1). The literature describes that *Citrus* essential oils have chemical compositions rich in limonene, but there are also essential oils where the major compounds with the highest percentages are 2- $\beta$ -pinene and  $\delta$ -3-carene [17,18].

The essential oils showed antifungal activity against all strains tested (Table 2), where *C. limon* showed a MIC ranging from 0.625-0.312 mg/mL and a MFC of 1.25-0.312 mg/mL.

1  
2  
3  
4 *C. sinensis* showed a MIC ranging from 1.25-0.625 mg/mL and a MFC of 1.25 mg/mL for the  
5  
6 strains tested. Limonene, on the other hand, had a MIC between 2.5-1.25 mg/mL and a MFC  
7  
8 of 2.5 mg/mL. The results of the control tests with the antifungals amphotericin B and  
9  
10 fluconazole were MIC and MFC of 0.5 µg/mL for all strains tested with amphotericin B, and  
11  
12 those of fluconazole were MIC ranging from 1-2 µg/mL and MFC between 4-8 µg/mL. The  
13  
14 results of limonene demonstrate that despite being the major compound of EOs, it alone  
15  
16 presents lower antifungal activity than the essential oils themselves. This can be explained by  
17  
18 the fact that the overall performance of essential oils is often attributed to synergistic or additive  
19  
20 interactions between their primary and secondary constituents [19].  
21  
22  
23  
24

25 The essential oils showed similar time-to-kill kinetics, where after 10 h the compounds  
26  
27 killed 100% of the treated cells (Figure 1a). After 8 h of treatment, *C. limon* and *C. sinensis*  
28  
29 reduced 27.65% and 25.6% of the cells, respectively. Amphotericin B reduced 43.75% of the  
30  
31 cells after 4 h, and after 8 h of treatment, it eliminated 100% of the cells. Fluconazole reduced  
32  
33 34.04% after 8 h and, after 24 h, eliminated 48.94% of the cells (Figure 1a). Regarding the  
34  
35 analysis of the morphology of the treated cells, it was possible to observe that the colonies of  
36  
37 the *C. limon* and amphotericin B treatments decreased in size until they no longer showed any  
38  
39 growth. *C. sinensis* did not show any changes in colony size reduction, but they did not show  
40  
41 any further growth after 10 h. Fluconazole reduced colony size but showed growth after 24 h  
42  
43 (Figure 1b). The results of the EOs showed a fungicidal effect very similar to that of  
44  
45 amphotericin B, eliminating 100% of the cells after 10 h of treatment, while amphotericin B  
46  
47 showed this effect after 8 h of treatment. Thakre and collaborators [20] tested the effect of  
48  
49 limonene on *C. albicans* in planktonic and biofilm forms. Limonene induced damage to the cell  
50  
51 wall and cell membrane, leading to oxidative stress, and causing DNA damage as well as  
52  
53 inducing apoptosis in *C. albicans*.  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 The combinations of essential oils with amphotericin B showed indifferent results  
5 (Table 3), that is, the combination of the compounds did not result in modulation. However, the  
6 combinations with fluconazole showed a synergistic effect for the combination with *C. sinensis*  
7 and an additive effect for the combination with *C. limon* (Table 3). In the combination of  
8 essential oils, the result was indifferent (Table 3). The synergistic effects obtained in the  
9 combination of *C. sinensis* with fluconazole and the additive of *C. limon* with fluconazole are  
10 promising, since they managed to reduce the MIC of both compounds for the strain tested. This  
11 demonstrates that both essential oils could be used as an alternative therapy combined with  
12 fluconazole, thus reducing the dose of the conventional antifungal during the patient's  
13 treatment. fluconazole, an antifungal agent of the azole class of compounds, is one of the first-  
14 line treatments for fungal infections. However, its prolonged use is related to an increase in  
15 acquired antifungal resistance in *C. albicans* [21,22]. Fluconazole is already administered in  
16 the therapy of fungal infections in combination with other antifungal agents to enhance its effect  
17 and thus reduce the use of others that have higher cytotoxicity, such as amphotericin B [23].  
18 Therefore, the combination of essential oils with fluconazole would reduce the length of the  
19 patient's hospital stay and the chances of the patient having adverse effects due to prolonged  
20 use of the standard antifungal agent and acquired antifungal resistance.  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 To our knowledge, combinations of these essential oils (EOs) and antifungals  
44 (fluconazole and amphotericin B) have not been previously investigated against *Candida*  
45 *albicans*. However, these oils are characterized by a large amount of limonene, which also has  
46 an antimicrobial effect and reported synergistic interactions with fluconazole. This compound  
47 increases the effectiveness of fluconazole by promoting chemosensitization of *Candida* cells to  
48 the antifungal [24]. Synergy with fluconazole is frequently observed with essential oils from  
49 various plants [25,26], while synergy with amphotericin B (a polyene) appears to be less  
50 consistent, often showing indifferent [27], and even antagonistic [28] effects across studies.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 Biofilm cells treated with *C. limon* showed 74.54% inhibition of adhesion at the MIC  
5 concentration, 87.36% at 2xMIC, and 91.58% at 4xMIC. *C. sinensis* showed 82.42% inhibition  
6 at the MIC concentration, 91.95% at 2xMIC, and 92.31% at 4xMIC. Amphotericin B, at the  
7 MIC, eliminated 74.36% of the cells, 83.7% at 2xMIC, and 89.2% at 4xMIC. Fluconazole  
8 treatments showed 72.35% inhibition at all concentrations tested (Figure 2a). The anti-adhesion  
9 effects that EOs presented are important to prevent biofilm formation. With *C. sinensis*  
10 presenting better anti-adhesion results than *C. limon*, even though the MIC of *C. limon* is lower  
11 than that of *C. sinensis*. Adhesion is one of the main virulence factors of *C. albicans* and one  
12 of the initiators of infectious foci [29].  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23

24  
25 Regarding the eradication of mature biofilm, the compounds did not show significant  
26 reduction against mature biomass compared to growth controls. *C. limon* eliminated only  
27 19.95% in MIC, 27.5% in 2xMIC, and 33.69% in 4xMIC. *C. sinensis* did not show inhibition  
28 in MIC, in 2xMIC it eliminated 28.84%, and in 4xMIC 40.97%. In the treatment controls with  
29 Amphotericin B, it reduced 25.88% in MIC, 46.1% in 2xMIC, and 46.37% in 4xMIC.  
30 Fluconazole did not show inhibition in any of the treatments (Figure 2b). Biofilm cells are  
31 protected from external actions, and once the biofilm is formed, it becomes more difficult to  
32 kill the cells due to their high resistance, since the biofilm has its own antifungal resistance  
33 mechanisms, such as the extracellular matrix, which limits drugs from binding to the sites of  
34 action. In this context, although the compound did not show significant activity in eliminating  
35 mature biofilm, it demonstrated a strong anti-adhesion effect. These anti-adhesion properties of  
36 *Citrus* essential oils against *C. albicans* demonstrate that they are good alternatives for blocking  
37 therapy. In clinical practice, blocking therapy is an alternative to prevent biofilm formation on  
38 catheters or when catheter replacement is not possible. It prevents infection from progressing  
39 and further hindering therapy due to biofilm formation [30].  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

Microscopy of cells treated with the compounds to evaluate the effects on the morphology of *C. albicans* showed that the essential oils, in addition to inhibiting biofilm formation, were able to act on polymorphism, inhibiting the formation of hyphae and pseudohyphae at all concentrations tested (Figure 3). The effects of *Citrus* oils were similar to those of amphotericin B, unlike fluconazole, which still showed hyphae formation at a concentration of 2xMIC (Figure 3). The morphological change of *C. albicans* from blastoconidium to filamentous is fundamental for its opportunistic pathogenicity. Filamentous structures are necessary for the invasion of fungal cells into host cells and act in the structuring of the biofilm, forming a three-dimensional structure and increasing the thickness of the extracellular matrix, thus protecting the cells from the action of drugs [29,31]. Ahmedi and colleagues [32] verified that limonene has the ability to inhibit adhesin and hyphal transition enzymes, preventing biofilm formation in *C. albicans*. Thus, the fungicidal effect exhibited by *Citrus* essential oils is related to their main component. This suggests that *Citrus* essential oils exhibit mechanisms of action with affinity for adhesins and polymorphic enzymes of *C. albicans*. The effects presented by EOs are promising for combating the virulence of *C. albicans*, preventing opportunistic pathogenicity by inhibiting polymorphism and adhesion, and, consequently, biofilm formation.

The evaluation of the effects of *Citrus* on the treated mature biofilm cells showed that EOs were able to slightly alter the morphology. It was possible to observe that they reduced the biomass density already in the CIM treatment, and in 4xCIM the cells are further apart, but there are still cells with filamentous morphology (Figure 3). The observed reductions are small compared to the growth control, but the results of the EO treatments were again similar to those of amphotericin B (Figure 3). Radithia and colleagues [33] observed that the essential oil from *C. limon* bark damaged the extracellular matrix structure of the *C. albicans* biofilm. This was achieved by disrupting the chitin bond in the 1,3- $\beta$ -glucan composition and inhibiting chitinase

1  
2  
3  
4 synthesis in the formation of the extracellular matrix, thus interrupting hyphal formation. The  
5  
6 authors associate this effect with limonene.  
7

8  
9 For hemolytic activity, the EOs presented LC<sub>50</sub> values higher than those of the two  
10  
11 antifungals, with *C. limon* presenting hemolysis at 14,000 µg/mL and *C. sinensis* at 13,000  
12  
13 µg/mL, while amphotericin B was at 156 µg/mL and fluconazole at 6,000 µg/mL (Figure 4).  
14  
15 Presenting lower cytotoxicity compared to the two antifungals, *C. limon* showed an LC<sub>50</sub>  
16  
17 approximately 40x higher than the MIC of strain ATCC 90028, which is 0.312 mg/mL, and *C.*  
18  
19 *sinensis* 10x higher than the MIC for the same strain, which is 1.25 mg/mL. Cavalcante and  
20  
21 contributors [34] evaluated the hemolysis values of amphotericin B, where the antifungal was  
22  
23 able to promote 70% hemolysis at a concentration of 12.5 µg/mL. For fluconazole, no studies  
24  
25 were found with human erythrocytes. The results obtained in this study demonstrate that EOs  
26  
27 have safe cytotoxicity ranges, being promising therapeutic potentials.  
28  
29  
30  
31

32  
33 Pharmacokinetic predictions were performed for the major compounds present in *Citrus*  
34  
35 species (Table 4). All compounds showed high water solubility, with values  $\leq 4$  indicating  
36  
37 soluble compounds. All compounds also showed excellent intestinal absorption values, well  
38  
39 above the 30% threshold that indicates absorption by the small intestine. Another parameter for  
40  
41 assessing intestinal absorption is CaCO<sub>2</sub> permeability, calculated as the logarithm of the  
42  
43 apparent permeability coefficient (log P<sub>app</sub>, cm/s), whose threshold value, which indicates  
44  
45 intestinal absorption capacity, is above 0.9 cm/s. Only eucalyptol showed low skin  
46  
47 permeability, with a threshold parameter of logK<sub>p</sub> > -2. The remaining compounds showed  
48  
49 permeabilities between logK<sub>p</sub> -1.342 and 1.721. Limonene and eucalyptol were considered  
50  
51 substrates for P-glycoprotein; however, neither compound was found to be an inhibitor for the  
52  
53 P-glycoprotein I and P-glycoprotein II models.  
54  
55  
56

57  
58 To assess compound distribution, we used VD<sub>ss</sub> (Volume of Distribution at Steady  
59  
60 State), the unbound fraction in plasma, and blood-brain barrier permeability. VD<sub>ss</sub> is

1  
2  
3  
4 considered low if less than 0.71 L/kg (Log VD<sub>ss</sub> < -0.15) and high if above 2.81 L/kg (Log  
5  
6 VD<sub>ss</sub> > 0.45).  $\beta$ -pinene, eucalyptol, and sabinene presented the highest VD<sub>ss</sub> indices, with  
7  
8 values above 0.19 log L/kg, indicating their ability to distribute more widely across tissues. The  
9  
10 unbound fraction of the drug in plasma is essential not only for assessing drug safety and  
11  
12 adverse effects, especially in patients with hypoalbuminemia. All compounds were able to cross  
13  
14 the blood-brain barrier. This predicted permeability to the blood-brain barrier suggests that the  
15  
16 compound has potentially relevant pharmacokinetic properties for applications in the central  
17  
18 nervous system. However, this inference is based solely on in silico predictions and does not  
19  
20 provide direct clues about therapeutic efficacy in CNS infections, which depend on further  
21  
22 experimental validation.  
23  
24  
25  
26

27 Drug metabolism involves cytochrome P450 enzymes. Limonene was the only  
28  
29 compound that inhibited the CYP1A2 isoform, suggesting that the other compounds have  
30  
31 activity with minimal toxicity. None of the drugs were predicted to be substrates for the kidney-  
32  
33 specific protein OCT2 and, therefore, are not transported by this protein, possibly being  
34  
35 eliminated through other available pathways, such as bile, breath, feces, and sweat.  
36  
37  
38

39 To assess toxicity, the AMES (Mutagenicity Evaluation System) parameters were used,  
40  
41 which assess whether a compound has mutagenic potential. *hERG* is a protein that regulates the  
42  
43 heart's electrical activity. Inhibitors of this protein lead to ventricular arrhythmias that can be  
44  
45 fatal. Therefore, assessing *hERG* I/II inhibition is a critical aspect of drug development to avoid  
46  
47 cardiotoxicity. Cytotoxic potential against the skin and liver was evaluated. No compound  
48  
49 showed toxicity using the AMES parameters, *hERG* I/II inhibition, or hepatotoxicity. However,  
50  
51 limonene, citronellal, and eucalyptol were evaluated as toxic to the skin. Therefore, these  
52  
53 compounds have selective toxicity, as they do not affect other organs, such as the heart and  
54  
55 liver, at levels that cause systemic toxicity.  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4           Gastrointestinal absorption and blood-brain barrier passage of the selected compounds  
5  
6 were also represented by the boiled egg prediction (Figure 5). The compounds present in the  
7  
8 yellow zone in the boiled-egg plot can permeate the blood-brain barrier (BBB). In this case, all  
9  
10 compounds are capable of crossing the barrier, as previously predicted by ADMET distribution  
11  
12 analyses.  
13  
14

15  
16           The pharmacokinetic prediction results of this study corroborate those obtained by  
17  
18 Sánchez-Martínez and contributors [35], who performed *in silico* predictions and experimental  
19  
20 tests of *Citrus* constituents, where limonene and  $\beta$ -pinene showed water solubility and good  
21  
22 intestinal absorption, and that the ability to cross the blood-brain barrier and tissue distribution  
23  
24 are characteristics observed in *Citrus* monoterpenes, in addition to low toxicity. Thus,  
25  
26 confirming safe profiles for use as alternative therapy.  
27  
28

29  
30           However, despite the oils proving to be efficient and safe according to ADMET  
31  
32 properties, it is important to highlight that there are limitations to their *in silico* use for studying  
33  
34 these properties. Among these limitations are the small size of reference databases and the fact  
35  
36 that the compounds present in these databases may be very simple and bear little resemblance  
37  
38 to the modern structures typically used in drug discovery projects [36].  
39  
40

41  
42           The results obtained in this study demonstrate that the essential oils of *C. limon* and *C.*  
43  
44 *sinensis* exhibit significant antifungal activity against *C. albicans*. Both contain limonene as the  
45  
46 major compound, followed by other monoterpenic hydrocarbons. The oils also showed an  
47  
48 important synergistic effect with fluconazole, which opens new possibilities within  
49  
50 conventional therapy, increasing efficacy and reducing microorganism resistance. The ADMET  
51  
52 properties of the major compounds revealed that the oils were safe and effective. Cytotoxicity  
53  
54 data also corroborate the safety of the oils, as they showed a low cytotoxic effect on  
55  
56 erythrocytes. The anti-adhesive and polymorphic effects reinforce the findings, acting against  
57  
58 two virulence factors that favor the pathogenicity of *C. albicans*. These properties make these  
59  
60

1  
2  
3  
4 compounds promising candidates for use in biofilm blocking therapy, which aims to prevent  
5  
6 the formation of these biofilms on medical devices or human tissues. However, future studies  
7  
8 are needed to investigate their *in vivo* application and elucidate the molecular mechanisms  
9  
10 involved in their antifungal action.  
11  
12  
13  
14

## 15 **Material and Methods**

### 16 **Plant material**

17  
18  
19  
20 The leaves of *C. limon* and *C. sinensis* were collected, in the morning, on a property in  
21  
22 the city of Sobral-CE (3°39'32.1"S, 40°22'58.1"W), during the rainy season, in March 2023.  
23  
24 The leaves were immediately taken for extraction and one sample was sent to the Professor  
25  
26 Francisco José de Abreu Matos Herbarium (HUVA) of the Vale do Acaraú State University,  
27  
28 where it was authenticated and a supporting specimen deposited (HUVA n°. 27038 of *Citrus*  
29  
30 *limon* and HUVA n°. 27037 of *Citrus sinensis*).  
31  
32  
33  
34  
35  
36

### 37 **Extraction of the essential oils**

38  
39 Fresh leaves of *C. limon* (405 g) and *C. sinensis* (349 g) were subjected to  
40  
41 hydrodistillation for 2 hours in a Clevenger-type dosing device. The essential oils were dried  
42  
43 over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (~1g) filtered, and stored in a sealed bottle at 4°C. The yield was  
44  
45 determined by the ratio of the final quantity of essential oil obtained and the mass of fresh leaves  
46  
47 used in the extraction:  $R = [v(\text{mL})/w(\text{g})] * 100$ . And the density was determined by the  
48  
49 calculation:  $D = m(\text{g})/v(\text{mL})$ .  
50  
51  
52  
53  
54

### 55 **Analysis of the chemical constituents by GC-MS**

56  
57 GC-MS analysis was performed on an Agilent instrument model GC-7890B/MSD-  
58  
59 5977A (quadrupole), with electron impact at 70 eV, HP-5MS column (30 m x 0.25 mm x 0.25  
60

1  
2  
3  
4  $\mu\text{m}$ , Agilent), helium carrier gas with a flow of 1.00 mL/min injector temperature 250°C,  
5  
6 detector temperature 150°C and ion source 230°C, transfer line temperature 280°C.  
7  
8 Chromatographic oven programming: initial temperature of 70°C, with a heating ramp of  
9  
10 4°C.min<sup>-1</sup> to 180 °C and an increase of 10°C/min to 250°C at the end of the run (34.5 min). The  
11  
12 identification of the compounds was performed by analyzing the fragmentation patterns  
13  
14 displayed in the mass spectra with those present in the database provided by the equipment  
15  
16 (NIST version 2.0 of 2012 – 243,893 compounds), and literature data [37].  
17  
18  
19  
20  
21

### 22 ***Candida albicans* strains**

23  
24  
25 The standard strain of *C. albicans* was obtained from the American Type Culture  
26  
27 Collection (ATCC 90028). The clinical isolates LABMIC 0102, LABMIC 0104, and LABMIC  
28  
29 0105 were obtained from Santa Casa de Misericórdia Hospital in Sobral (Ceará, Brazil) with  
30  
31 ethics committee number 644,365. The strains LABMIC 0134, LABMIC 0135, and LABMIC  
32  
33 0136 were isolated from HIV-positive patients and provided by the Mycoteca of UNILAB -  
34  
35 International Integration of Afro-Brazilian Lusophony University (Ceará, Brazil). All strains  
36  
37 were previously identified by the Vitek 2 system, and by chromogenic means using  
38  
39 CHROMagar-*Candida* medium. These strains were stored in the microbiology laboratory of  
40  
41 Acaraú Valley State University, where they were maintained on Sabouraud dextrose agar  
42  
43 (SDA).  
44  
45  
46  
47  
48  
49

### 50 **Broth microdilution method**

51  
52 The broth microdilution test was performed according to CLSI M27-A3 [38] standard,  
53  
54 with modification. *C. albicans* strains were grown in Sabouraud Dextrose Agar (SDA) tubes  
55  
56 and incubated for 24 h at 37°C. The inoculum was prepared using the McFarland 0.5 scale (10<sup>6</sup>  
57  
58 CFU/mL), followed by a dilution in RPMI-1640 of 1:2000 (2 × 10<sup>2</sup> CFU/mL). The compounds  
59  
60

1  
2  
3  
4 were diluted to a concentration of 10 mg/mL with RPMI-1640 and 5% DMSO (v/v). In 96-well  
5  
6 U-bottom plates, 100  $\mu$ L of RPMI were distributed in all wells. Then, 100  $\mu$ L of the compounds  
7  
8 were added, and serial dilutions were performed in the concentration range of 10-0.004 mg/mL.  
9  
10 Amphotericin B was used as a control in the concentration range of 16-0.25  $\mu$ g/mL and  
11  
12 fluconazole 64-0.5  $\mu$ g/mL. The plates were incubated for 24 h at 37°C. The minimum inhibitory  
13  
14 concentration (MIC) was the lowest concentration at which no visual growth was observed on  
15  
16 the plate. To determine the minimum fungicidal concentration (MFC) of the compounds, 50  $\mu$ L  
17  
18 aliquots of the medium present in the wells of the 96-well plate that did not show fungal growth  
19  
20 were removed and plated on petri dishes with Sabouraud dextrose agar (SDA) culture medium.  
21  
22 The plates were incubated at 37°C for 24 h [39]. The experiment was performed in triplicate.  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

### 30 **Time–kill assay**

31  
32 Suspensions of yeast strain ATCC 90028 diluted in RPMI-1640 medium with 2%  
33  
34 MOPS, prepared using the McFarland scale 0.5 ( $10^6$  CFU/mL), were added to 96-well plates.  
35  
36 Then, treatments of each compound at inhibitory concentrations were added. The plates were  
37  
38 incubated at 37°C for 24 h, and 100  $\mu$ L aliquots were removed at predetermined times of 0, 4,  
39  
40 8, 10, 12, and 24 h. The aliquots were serially diluted (four-fold) in saline solution and plated  
41  
42 on plates containing Sabouraud dextrose agar (SDA) medium. The numbers of colonies were  
43  
44 counted after incubation of the plates at 37°C for 24 h. At the time of death, 2  $\mu$ L aliquots were  
45  
46 removed from each of the treatments and added to the surface of plates with SDA. After the  
47  
48 aliquots dried, the plates were incubated at 37°C for 24 h [40]. The CFU/mL was calculated as  
49  
50 the average of two replicates, and results will be reported in log<sub>10</sub> CFU/mL. The CFU/mL was  
51  
52 calculated by multiplying the number of colonies by the inverse of the dilution and by the  
53  
54 dilution factor 10.  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## Checkerboard assays

For the assays, the yeast strain ATCC 90028 was used, where the turbidity of the fungal suspensions was prepared using the McFarland scale 0.5 ( $10^6$  CFU/mL). The tested compounds were used at concentrations determined from their respective MICs. Initially, 50  $\mu$ L of RPMI-1640 medium was added to all 96 wells of the microdilution plate. Then, 50  $\mu$ L of the essential oils were added, and serial dilutions were made from this concentration. Then, 50  $\mu$ L of the commercial antifungals, amphotericin B and fluconazole, were added at different concentrations, which were serially diluted in falcon tubes. Finally, 100  $\mu$ L of the inoculum was added to all wells. MIC controls were performed for each compound, in addition to the negative control containing only the medium and the positive growth control with medium and inoculum. The plates were incubated at 37°C for 24 h. The interaction of the drugs was ascertained by calculating the fractional inhibitory concentration index (FICI). The FICI is calculated by adding the fractional inhibitory concentration (FIC) for each of the tested compounds, being defined as the addition of the MIC values of each drug in the combination divided by the MIC of the drug alone [41]. In the equations, A represents the essential oils and B the antifungal, fluconazole or amphotericin B.

$$\text{FICI} = \text{FIC}_A + \text{FIC}_B = (\text{CIM}_{AB} : \text{CIM}_A) + (\text{CIM}_{BA} : \text{CIM}_B)$$

## Biofilm inhibition and eradication assay

Biofilm antiadhesion assays were evaluated by quantifying total biomass using crystal violet. Yeast strain ATCC 90028 was used, where the inoculum was suspended in RPMI-1640 with 2% glucose and the concentration was adjusted in a spectrophotometer to  $2 \times 10^6$  cells per mL. 100  $\mu$ L of fungal suspension was added to the flat-bottomed polystyrene plate. After the inoculum, treatments of each compound were added at MIC, 2xMIC and 4xMIC concentrations. Biofilm formation controls were performed. The plates were incubated for 48

1  
2  
3  
4 h at 37°C. After the incubation period, the plates were washed three times with 200 µL of saline  
5  
6 to remove planktonic cells. The biofilm was fixed with 200 µL of methanol (99%) for 10 min,  
7  
8 after which it was removed from the wells and allowed to dry. 200 µL of 1% (M/V) crystal  
9  
10 violet was added to the wells for 10 min to stain the cells. They were then washed three times  
11  
12 with sterile distilled water. After the plate was dry, 200 µL of 33% (v/v) acetic acid was added  
13  
14 to the wells for 10 min to dissolve the dye present in the adhered cells. 150 µL was transferred  
15  
16 to a new plate and the reading was taken on the spectrophotometer at 590 nm. The % biofilm  
17  
18 inhibition was defined as: % = 100 – (OD of the treated sample/OD of the untreated positive  
19  
20 control) x 100 [42]. For eradication of mature biofilm, 200 µL of fungal suspension were added  
21  
22 to the wells of the polystyrene plate and incubated for 48 h at 37°C. After the incubation period,  
23  
24 the wells were washed with saline to remove planktonic cells. Then, treatments of each  
25  
26 compound were inserted at concentrations of MIC, 2xMIC and 4xMIC. The plate was then  
27  
28 incubated again for 24 h at 37°C. Subsequently, the plate was washed again with saline and the  
29  
30 same process was performed as previously described for reading in the spectrophotometer at  
31  
32 590 nm. The results are expressed as the mean plus or minus the standard deviation of two  
33  
34 independent experiments.  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

### 43 **Effect of *Citrus* oils on the morphology of *Candida albicans***

44  
45 The ability of essential oils to inhibit biofilm formation and their effect on the  
46  
47 morphology of *C. albicans* were observed by light optical microscopy. For this, cultures of *C.*  
48  
49 *albicans* ATCC 90028 were placed on coverslips, and the same treatments described in the in  
50  
51 vitro biofilm adhesion inhibition assay were performed. The plates were incubated for 48 h at  
52  
53 37°C. After the incubation period, the plates were washed three times with saline to remove  
54  
55 planktonic cells, the biofilm was fixed with methanol (99%) for 10 min, and the cells were  
56  
57 stained with 1% crystal violet (w/v) for 10 min. The coverslips were viewed under an inverted  
58  
59  
60

1  
2  
3  
4 light optical microscope at 400x [43]. For microscopy of mature biofilm eradication, cultures  
5  
6 were placed on coverslips, and the plates were incubated for 48 h at 37°C. After the incubation  
7  
8 period, the plates were washed three times with saline to remove planktonic cells, and  
9  
10 treatments were added, as described in the mature biofilm assays. The plates were again  
11  
12 incubated at 37°C for 24 h. The plates were washed three times with saline after the incubation  
13  
14 period, and the same process as previously described for visualization of the coverslips was  
15  
16 performed.  
17  
18  
19  
20  
21

### 22 23 **Hemolytic toxicity**

24  
25 Using EDTA tubes, 10 mL of fresh human blood was collected from a donor (ethics  
26  
27 committee approval number 6,662,155) and centrifuged at 1000 g for 10 min at 4°C. After  
28  
29 removal of plasma, the pellet containing red blood cells (RBCs) was washed five times with  
30  
31 PBS and then resuspended in PBS to obtain a solution with 8% (v/v) erythrocytes. Aliquots of  
32  
33 100 µL of this suspension were added to microcentrifuge tubes containing 100 µL of each  
34  
35 compound diluted serially, with concentrations ranging from 20–0.039 mg/mL for EOs, 250–  
36  
37 30 µg/mL for amphotericin B, and 7,500–3,000 µg/mL for fluconazole. The final concentrations  
38  
39 of the erythrocyte suspension were 4% (v/v). These suspensions were homogenized by  
40  
41 vortexing and incubated for 2 h at 37°C. After the incubation time, the supernatants were  
42  
43 transferred to a 96-well microdilution plate, and hemoglobin release was measured by  
44  
45 absorbance at 540 nm. Triton X-100 at 1% and 4% (v/v) of RBCs in PBS without essential oils  
46  
47 (untreated) were used as positive and negative controls, respectively. The percentage of  
48  
49 hemolysis was calculated as  $[(\text{Abs } 540 \text{ nm treated} - \text{Abs } 540 \text{ nm untreated}) / (\text{Abs } 540 \text{ nm } 1\% \text{ Triton X-100} - \text{Abs } 540 \text{ nm untreated})] \times 100$ , and the experiments were performed in triplicate  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57 [34].  
58  
59  
60

## Statistical analysis

The biofilm assay data were submitted to one-way analysis of variance (ANOVA), followed by the Tukey multiple comparison test using GraphPad Prism version 8.0. Cytotoxicity was assessed by calculating the LC<sub>50</sub> values. Initially the logarithmic transformation was performed and subsequent normalization of data percentage, where negative control (non-treated cells) optical density were stated as 100% of viability and Triton X-100 was considered as 100% mortality. The LC<sub>50</sub> values obtained after treatment of cells with essential oils were calculated using a non-linear regression curve using the GraphPad Prism program with a confidence interval of 95%.

## Pharmacokinetics

The compounds present in the chemical constitution of *Citrus* essential oils (EOs) were obtained from the PubChem database (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>), in the canonical SMILES format (limonene CID: 22311;  $\beta$ -pinene CID: 14896; citronellal CID: 7794; eucalyptol CID: 2758; sabinene CID: 18818). The absorption, distribution, metabolism, and excretion (ADMET) properties were predicted using the pkCSM software (<https://biosig.lab.uq.edu.au/pkcsm/prediction>) [44]. Additionally, the SwissADME software (<http://www.swissadme.ch/>) was used to generate the BOILED-Egg graph, which illustrates the ability of the compounds to interact with P-glycoprotein (P-gp) and cross the blood-brain and gastrointestinal barriers, in addition to providing parameters related to lipophilicity and polarity [45].

## Contributors' Statement

1  
2  
3  
4 Investigation of data on antifungal activities and writing—preparation of the original draft: M.  
5 A. A. Fernandes; Writing—review and editing: F. L. L. Aguiar; Hemolytic activity assays: P.  
6 H. L. Rodrigues; Prediction of the pharmacokinetics of chemical constituents: M. D. L. T.  
7 Martins; Botanical identification: E. B. Souza; Data collected from essential oils extraction: J.  
8 P. C. Vale; Data collected on chemical composition of essential oils: T. H. S. Rodrigues; Strains  
9 LABMIC 0134, LABMIC 0135 and LABMIC 0136 used in the study: E. H. S. Brito; Validation  
10 and study design. All authors read and approved the manuscript submission: R. O. S.  
11 Fontenelle.  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

25 **Funding:** The authors are grateful for federal and state resources agencies for financial support.  
26 M.A.A.F. is the recipient of a master's scholarship from the Coordination of Improvement of  
27 Higher Education Personnel (CAPES), Ministry of Education and Culture (MEC), Federal  
28 Government of Brazil. F.L.L.A. is thankful of a postdoctoral scholarship from State Funding  
29 Agency (FUNCAP), through the Regional Scientific and Technological Development Program-  
30 PDCTR (Announcement 03/2021). R.O.S.F. is thankful to the State Funding Agency  
31 (FUNCAP), grant number BP5-0197-00040.01.00/22.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42

43 **Acknowledgments:** To Dr. Kaoli Pereira Cavalcante, coordinator of Cymbella - Center for  
44 Phycological Studies in the Semi-Arid Region, for providing the microscopes used in this work.  
45  
46  
47  
48  
49

50 **Data Availability Statement:** All data supporting the findings of this study are available within  
51 the paper.  
52  
53  
54  
55  
56

57 **Ethical approval:** To subjects the ethical aspects of research involving human subjects this  
58 study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki and was  
59  
60

1  
2  
3  
4 approved by the Institutional Review Board from the Acaraú Valley State University (UVA)  
5  
6 under the number approval number: 644,365, following the ethical aspects of the resolution  
7  
8 466/2012 and 510/2016 of the National Health Council. Additionally, another substantiated  
9  
10 statement was approved by the Institutional Review Board for collections for hemolysis assays  
11  
12 under committee approval number 6,662,155. The ethical principles of respect for the person  
13  
14 (autonomy and protection of vulnerable groups), beneficence, non-maleficence, justice and  
15  
16 equity were followed. All the names and private information of patients were kept confidential.  
17  
18  
19  
20  
21  
22

23 **Conflict of interest:** The authors declare no conflict of interest.  
24  
25  
26

## 27 **References**

- 28  
29 [1] Reinhardt LC, Nascente PS, Ribeiro JS, Guimarães VBS, Etges A, Lund RG. Sensitivity to  
30  
31 antifungals by *Candida* spp samples isolated from cases of chronic atrophic candidiasis (CAC).  
32  
33 Brazilian Journal of Biology 2019; 80:266-272. DOI: 10.1590/1519-6984.190454  
34  
35 [2] Xiao M, Chen SC, Kong F, Xu XL, Yan L, Kong HS, Fan X, Hou X, Cheng JW, Zhou ML,  
36  
37 Li Y, Yu SY, Huang JJ, Zhang G, Yang Y, Zhang JJ, Duan SM, Kang W, Wang H, Xu YC.  
38  
39 Distribution and antifungal susceptibility of *Candida* species causing candidemia in China: an  
40  
41 update from the CHIF-NET study. The Journal of Infectious Diseases 2020; 221:139-  
42  
43 147. DOI: 10.1093/infdis/jiz573  
44  
45 [3] Kadosh D. Regulatory mechanisms controlling morphology and pathogenesis in *Candida*  
46  
47 *albicans*. Current Opinion in Microbiology 2019; 52:27-34. DOI: 10.1016/j.mib.2019.04.005  
48  
49 [4] Abdulghani M, Iram R, Chidrawar P, Bhosle K, Kazi R, Patil R, Kharat K, Zore G.  
50  
51 Proteomic profile of *Candida albicans* biofilm. Journal of Proteomics 2022; 265:104661. DOI:  
52  
53 10.1016/j.jprot.2022.104661  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 [5] Vitiello A, Ferrara F, Boccellino M, Ponzo A, Cimmino C, Comberinati E, Zovi A, Clemente  
5 S, Sabbatucci M. Antifungal Drug Resistance: An Emergent Health Threat. *Biomedicines*  
6 2023; 11:1063. DOI: 10.3390/biomedicines11041063  
7  
8  
9  
10 [6] Carmo A, Rocha M, Pereirinha P, Tomé R, Costa E. Antifungals: From Pharmacokinetics  
11 to Clinical Practice. *Antibiotics* 2023; 12:884. DOI: 10.3390/antibiotics12050884  
12  
13  
14 [7] Sánchez-Villacreses EM, Tapia JC, Cáceres-Valdiviezo MJ, Morey-León G, Fernández-  
15 Cadena JC, Andrade-Molina DM. Basal expression of *ERG11*, *MDR1* and *CDR1* genes in  
16 clinical isolates of *Candida albicans* from Ecuador: insights into azole resistance surveillance.  
17 *All Life* 2025; 18:2551757. DOI: 10.1080/26895293.2025.2551757  
18  
19  
20 [8] Hon KLE, Chan VP, Leung AK, Leung KKY, Hui WF. Invasive fungal infections in  
21 critically ill children: epidemiology, risk factors and antifungal drugs. *Drugs in Context* 2024;  
22 13:2023-9. DOI: 10.7573/dic.2023-9-2  
23  
24 [9] Iqbal M, Parveen R, Parveen A, Parveen B, Aref, IM. Establishing the botanical identity of  
25 plant drugs based on their active ingredients under diverse growth conditions. *Journal of*  
26 *environmental biology* 2018; 39:123-136. DOI: 10.22438/jeb/39/1/MS-255  
27  
28 [10] Klimek-Szczykutowicz M, Szopa A, Ekiert H. *Citrus limon* (Lemon) Phenomenon—A  
29 Review of the Chemistry, Pharmacological Properties, Applications in the Modern  
30 Pharmaceutical, Food, and Cosmetics Industries, and Biotechnological Studies. *Plants* 2020;  
31 9:119. DOI: 10.3390/plants9010119  
32  
33 [11] Favela-Hernández MJM, González-Santiago O, Ramírez-Cabrera MA, Esquivel-Ferriño  
34 PC, Camacho-Corona MDR. Chemistry and Pharmacology of *Citrus sinensis*. *Molecules* 2016;  
35 21:247. DOI: 10.3390/molecules21020247  
36  
37 [12] Dosoky NS, Setzer WN. Biological activities and safety of *Citrus* spp. essential oils.  
38 *International journal of molecular sciences* 2022; 23:5895. DOI: 10.3390/ijms19071966  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 [13] Manzur M, Luciardi MC, Blázquez MA, Alberto MR, Cartagena E, Arena ME. *Citrus*  
5 *sinensis* Essential Oils an Innovative Antioxidant and Antipathogenic Dual Strategy in Food  
6 Preservation against *Spoilage* Bacteria. *Antioxidants* 2023; 12:246. DOI:  
7 10.3390/antiox12020246  
8  
9 [14] Hamdan M, Jaradat N, Al-Maharik N, Ismail S, Qadi M. Chemical composition, cytotoxic  
10 effects and antimicrobial activity of combined essential oils from *Citrus meyeri*, *Citrus*  
11 *paradise*, and *Citrus sinensis* leaves. *Industrial Crops and Products* 2024; 210:118096. DOI:  
12 10.1016/j.indcrop.2024.118096  
13  
14 [15] Roos VC, Denardi LB, Teixeira CA, Machado VS, Verdi CM, Santos ID dos, Wagner R,  
15 Sagrillo MR, Pacheco PS, Gindri AL, Santos RCV. Chemical composition, antifungal activity,  
16 antibiofilm and citotoxicity of the essential oil of *Citrus deliciosa* tenore. *Natural Product*  
17 *Research* 2024; 38:4059-4064. DOI: 10.1080/14786419.2023.2269590  
18  
19 [16] Chaudhary PK, Saini D, Srivastava AK, Prasad R. Assessment of antifungal and anti-  
20 biofilm potential of essential oil active constituents alone and in combinatorial mode of  
21 limonene and linalool against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *Natural Product*  
22 *Research* 2025; 39:1-6. DOI: 10.1080/14786419.2025.2526731  
23  
24 [16] Nidhi P, Rolta R, Kumar V, Dev K, Sourirajan A. Synergistic potential of *Citrus*  
25 *aurantium* L. essential oil with antibiotics against *Candida albicans*. *Journal of*  
26 *Ethnopharmacology* 2020; 262:113135. DOI: 10.1016/j.jep.2020.113135  
27  
28 [18] Ambrosio CMS, Diaz-Arenas GL, Agudelo LPA, Stashenko E, Contreras-Castillo CJ, da  
29 Gloria EM. Chemical Composition and Antibacterial and Antioxidant Activity of a *Citrus*  
30 Essential Oil and Its Fractions. *Molecules* 2021; 26:2888. DOI: 10.3390/molecules26102888  
31  
32 [19] Fokas R, Giormezis N, Vantarakis A. Synergistic Approaches to Foodborne Pathogen  
33 Control: A Narrative Review of Essential Oils and Bacteriophages. *Foods* 2025; 14:1508. DOI:  
34 10.3390/foods14091508  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

- 1  
2  
3  
4 [20] Thakre A, Zore G, Kodgire S, Kazi R, Mulange S, Patil R, Shelar A, Santhakumari B,  
5 Kulkarni M, Kharat K, Karuppayil, SM. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by  
6 inducing apoptosis. *Medical Mycology* 2018; 56:565-578. DOI: 10.1093/mmy/myx074  
7  
8  
9  
10  
11 [21] Lu H, Shrivastava M, Whiteway M, Jiang Y. *Candida albicans* targets that potentially  
12 synergize with fluconazole. *Critical reviews in microbiology* 2021; 47:323-337. DOI:  
13 10.1080/1040841X.2021.1884641  
14  
15  
16  
17 [22] Sobel JD. Resistance to fluconazole of *Candida albicans* in vaginal isolates: a 10-year  
18 study in a clinical referral center. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2023; 67:e00181-  
19 23. DOI: 10.1128/aac.00181-23  
20  
21  
22  
23 [23] Vitale RG. Role of antifungal combinations in difficult to treat *Candida* infections.  
24 *Journal of Fungi* 2021; 7:731. DOI: doi.org/10.3390/jof7090731  
25  
26  
27  
28 [24] Ahmedi S, Khan I, Ghanem S, Manzoor N. Limonene synergistically augments  
29 fluconazole susceptibility in clinical *Candida* isolates from cleft lip and palate patients.  
30 *National Journal of Maxillofacial Surgery* 2024; 15:47-54. DOI: 10.4103/njms.njms\_34\_23  
31  
32  
33  
34 [25] Soulaïmani B, Varoni E, Iriti M, Mezrioui N-E, Hassani L, Abbad A. Synergistic  
35 Anticandidal Effects of Six Essential Oils in Combination with Fluconazole or Amphotericin  
36 B against Four Clinically Isolated *Candida* Strains. *Antibiotics* 2021; 10:1049. DOI:  
37 10.3390/antibiotics10091049  
38  
39  
40  
41 [26] Soulaïmani B, Nafis A, Kasrati A, Rochdi A, Mezrioui NE, Abbad A, Hassani L.  
42 Chemical composition, antimicrobial activity and synergistic potential of essential oil from  
43 endemic *Lavandula maroccana* (Mill.). *South African Journal of Botany* 2019; 125:202-206.  
44 DOI: 10.1016/j.sajb.2019.07.030  
45  
46  
47  
48 [27] Nafis A, Saad FE, Khalloufi FE, Kasrati A, Abbad A, Mezrioui N, Oudra B, Vasconcelos  
49 V, Hassani L. New insight into antimicrobial activities of *Linaria ventricosa* essential oil and  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

its synergetic effect with conventional antibiotics. Archives of microbiology 2021; 203:4361-4366. DOI: 10.1007/s00203-021-02391-7

[28] Elhidar N, Nafis A, Kasrati A, Goehler A, Bohnert JA, Abbad A, Hassani L, Mezrioui NE. Chemical composition, antimicrobial activities and synergistic effects of essential oil from *Senecio anteuphorbium*, a Moroccan endemic plant. Industrial crops and products 2019; 130:310-315. DOI: 10.1016/j.indcrop.2018.12.097

[29] Talapko J, Juzbašić M, Matijević T, Pustijanac E, Bekić S, Kotris I, Škrlec I. *Candida albicans* - the virulence factors and clinical manifestations of infection. Journal of Fungi 2021; 7:79. DOI: 10.3390/jof7020079

[30] Kovács R, Majoros L. Antifungal lock therapy: an eternal promise or an effective alternative therapeutic approach?. Letters in Applied Microbiology 2022; 74:851-862. DOI: 10.1111/lam.13653

[31] Atriwal T, Azeem K, Husain FM, Hussain A, Khan MN, Alajmi MF, Abid M. Mechanistic understanding of *Candida albicans* biofilm formation and approaches for its inhibition. Frontiers in Microbiology 2021; 12:46-78. DOI: 10.3389/fmicb.2021.638609

[32] Ahmedi S, Pant P, Raj N, Manzoor N. Limonene inhibits virulence associated traits in *Candida albicans*: *In-vitro* and *in-silico* studies. Phytomedicine Plus 2022; 2:100285. DOI: 10.1016/j.phyplu.2022.100285

[33] Radithia D, Tanjungsari R, Ernawati DS, Parmadiati AE. The effectiveness of essential oil from *Citrus limon* peel on *Candida albicans* biofilm formation: An experimental *in vivo* study. Journal of Taibah University Medical Sciences 2023; 18:190-195. DOI: 10.1016/j.jtumed.2022.07.011

[34] Cavalcante CSP, Falcão CB, Fontenelle RO, Andreu D, Rádis-Baptista G. Anti-fungal activity of Ctn [15–34], the C-terminal peptide fragment of crotalicidin, a rattlesnake venom gland cathelicidin. The Journal of antibiotics 2017; 70:231-237. DOI: 10.1038/ja.2016.135

- 1  
2  
3  
4 [35] Sánchez-Martínez JD, Bueno M, Alvarez-Rivera G, Tudela J, Ibañez E, Cifuentes A. *In*  
5 *vitro* neuroprotective potential of terpenes from industrial orange juice by-products. *Food &*  
6 *Function* 2021; 12: 302-314. DOI: 10.1039/D0FO02809F  
7  
8  
9  
10  
11 [36] Niu Z, Xiao X, Wu W, Cai Q, Jiang Y, Jin W, Wang M, Yang G, Kong L, Jin X, Yang G,  
12 Chen H. PharmaBench: Enhancing ADMET benchmarks with large language models.  
13 *Scientific Data* 2024; 11:985. DOI: 10.1038/s41597-024-03793-0  
14  
15  
16  
17  
18 [37] Adams RP. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass*  
19 *Spectroscopy*. 5 online ed. Gruver, TX USA: Texensis Publishing. 2017; 5:46-52.  
20  
21  
22  
23 [38] CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts;*  
24 *Approved Standard—Third Edition*. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and  
25 *Laboratory Standards Institute*. 2008; 3.  
26  
27  
28  
29 [39] Fontenelle ROS, Morais SM, Brito EHS, Kerntopf MR, Brilhante RSN, Cordeiro RA,  
30 Tomé AR, Queiroz MGR, Nascimento NRF, Sidrim JJC, Rocha MFG. Chemical composition,  
31 toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.  
32 *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2007; 59:934-940. DOI: 10.1093/jac/dkm066  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39 [40] Kwolek-Mirek M, Zadrag-Tecza R. Comparison of methods used for assessing the  
40 viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research* 2014; 14:1068-1079. DOI:  
41 10.1111/1567-1364.12202  
42  
43  
44  
45  
46 [41] Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-Zeichner L, Perfect JH. Combination antifungal  
47 therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2004; 48:693-715. DOI:  
48 10.1128/aac.48.3.693-715.2004  
49  
50  
51  
52  
53 [42] Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FLJr, Mowat E. A simple and reproducible  
54 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to  
55 antifungal susceptibility testing. *Nature Protocols* 2008; 3:1494-1500. DOI:  
56 10.1038/nprot.2008.141  
57  
58  
59  
60

[43] Fu Y, Wang W, Zeng Q, Wang T, Qian W. Antibiofilm efficacy of luteolin against single and dual species of *Candida albicans* and *Enterococcus faecalis*. *Frontiers in Microbiology* 2021; 12:715156. DOI: 10.3389/fmicb.2021.715156

[44] Hajlaoui H, Arraouadi S, Noumi E, Aouadi K, Adnan M, Khan MA, Kadri A, Snoussi M. Antimicrobial, antioxidant, anti-acetylcholinesterase, antidiabetic, and pharmacokinetic properties of *Carum carvi* L. and *Coriandrum sativum* L. essential oils alone and in combination. *Molecules* 2021; 26:3625. DOI: 10.3390/molecules26123625

[45] Rauf A, Khan H, Khan M, Abusharha A, Serdaroğlu G, Daglia M. *In silico*, SwissADME, and DFT studies of newly synthesized oxindole derivatives followed by antioxidant studies. *Journal of Chemistry* 2023; 2023:5553913. DOI: 10.1155/2023/5553913

**Table 1.** Chemical composition of the leaves of *C. limon* and *C. sinensis*.

Compounds	<i>Citrus limon</i>			<i>Citrus sinensis</i>		
	<sup>1</sup> IR <sub>cal</sub>	<sup>2</sup> IR <sub>lit</sub>	Area (%)	<sup>1</sup> IR <sub>calc</sub>	<sup>2</sup> IR <sub>lit</sub>	Area (%)
$\alpha$ -Pinene	936	932	1.65	936	932	1.28
Sabinene	976	969	7.1	975	969	5.85
$\beta$ -Pinene	981	974	16.49	981	974	14.61
Myrcene	992	988	1.12	992	988	0.71
<i>o</i> -Cymene	-	-	-	1026	1022	0.73
<b>Limonene</b>	1030	1024	<b>40.81</b>	1030	1024	<b>36.69</b>
Eucalyptol	1033	1026	7.83	1033	1026	10.48
delta-2-Carene	-	-	-	1102	1001	1.15
cis-Limonene oxide	-	-	-	1135	1132	2.74
cis- $\beta$ -Ocimene	1036	1032	0.53	-	-	-
trans- $\beta$ -Ocimene	1046	1044	1.82	-	-	-
Limonene epoxide	-	-	-	1139	1137	1.36
Citronellal	1153	1148	12.29	1153	1148	8.88
Terpinen-4-ol	1180	1174	0.51	1180	1174	0.54
$\alpha$ -Terpineol	1193	1186	2.2	1193	1186	2.57
Myrtenol	-	-	-	1199	1194	0.5
Citronellol	1229	1223	0.6	1229	1223	0.53
Neral	1242	1235	2.27	-	-	-
Geranial	1272	1264	2.57	1272	1264	1.35
cis-Pinocarvyl acetate	-	-	-	1309	1311	1.37
Myrtenyl acetate	-	-	-	1324	1324	0.72
Citronellyl acetate	1354	1350	0.62	1354	1350	1.11
$\beta$ -Caryophyllene	1421	1417	0.79	-	-	-

Caryophyllene oxide	-	-	-	1584	1582	0.8
<b>Total composition</b>				99.20	93.97	

<sup>1</sup>Calculated IR values.

<sup>2</sup>IR values from the literature (Adams, 2017).

**Table 2.** Result of the activity of the essential oils of *C. limon* and *C. sinensis*, and of the standard drugs, amphotericin B and fluconazole, against strains of *C. albicans*.

Strains	Source	<i>C. limon</i>		<i>C. sinensis</i>		Limonene		AMB		FLC	
		MI C	MF C	MI C	MF C	MI C	MF C	MI C	MF C	MI C	MF C
ATCC 90028	Culture collecti on	0.31 2	0.62 5	1.25	1.25	2.5	2.5	0.5	0.5	1	4
LABMI C 0102	Blood culture	0.31 2	0.62 5	0.62 5	1.25	2.5	2.5	0.5	0.5	2	8
LABMI C 0104	Trachea l aspirate	0.31 2	0.31 2	0.62 5	1.25	2.5	2.5	0.5	0.5	1	4
LABMI C 0105	Blood culture	0.62 5	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	0.5	0.5	1	4
LABMI C 0134	HIV+ oral mucosa	0.62 5	1.25	1.25	1.25	1.25	2.5	0.5	0.5	1	8
LABMI C 0135	HIV+ oral mucosa	0.62 5	1.25	1.25	1.25	2.5	2.5	0.5	0.5	1	4
LABMI C 0136	HIV+ oral mucosa	0.62 5	0.62 5	0.62 5	1.25	2.5	2.5	0.5	0.5	1	4

AMB:Amphotericin B; FLC:Fluconazole. The MICs and MFCs for EOs and limonene were determined in mg/mL, and for AMB and FLC in µg/mL.

**Table 3.** Checkerboard test of the essential oils *C. limon* and *C. sinensis* combined with the antifungals amphotericin B and fluconazole and combined with each other against the strain of *C. albicans* ATCC 90028.

Combinations	Individual	Combined	FICI	Effect
<i>C. limon</i>	0.312	0.312	2	Indifferent
Amphotericin B	0.5	0.5		
<i>C. limon</i>	0.312	0.156	0.75	Additive
Fluconazole	1	0.25		
<i>C. sinensis</i>	1.25	1.25	2	Indifferent
Amphotericin B	0.5	0.5		
<i>C. sinensis</i>	1.25	0.156	0.37	Synergistic
Fluconazole	1	0.25		
<i>C. limon</i>	0.312	0.312	2	Indifferent
<i>C. sinensis</i>	1.25	1.25		

FICI  $\leq$  0.5, synergistic; FICI  $>$  0.5 or  $<$  1.0, additive; FICI  $>$  1.0 and  $\leq$  4.0 indifferent; and FICI  $>$  4.0, antagonism.

**Table 4.** ADMET prediction of major compounds of essential oils from leaves of *C. limon* and *C. sinensis*.

	Limonene	$\beta$ -pinene	Citronellal	Eucalyptol	Sabinene	Unit
<b>Absorption</b>						
Water solubility	-3.568	-4.191	-3.465	-2.630	-4.629	Numeric (log mol/L)
Caco-2 permeability	1.401	1.385	1.503	1.485	1.404	Numeric (log Papp in $10^{-6}$ cm/s)
Intestinal absorption	95.898	95.525	95.359	96.505	95.356	Numeric Absorbed (%)
Skin permeability	-1.721	-1.653	-1.386	-2.437	-1.342	Numeric (log Kp)

P-g substrate	Yes	No	No	Yes	No	Categorical (Yes/No)
P-gI/II inhibitor	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
<b>Distribution</b>						
VDss (human)	0.396	0.685	0.192	0.491	0.566	Numeric (log L/kg)
Fraction unbound BBB permeability	0.480	0.350	0.420	0.553	0.295	Numeric (Fu)
CNS permeability	0.732	0.818	0.648	0.368	0.836	Numeric (log BB)
						Numeric (log PS)
	-2.370	-1.857	-2.049	-2.972	-1.463	
<b>Metabolism</b>						
CYP2D6 substrate	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP3A4 substrate	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP1A2 inhibitor	Yes	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP2C19 inhibitor	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP2C9 inhibitor	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP2D6 inhibitor	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
CYP3A4 inhibitor	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
<b>Excretion</b>						
Total Clearance	0.213	0.030	0.476	1.009	0.071	Numeric (log mL/min/kg)
Renal OCT2 substrate	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
<b>Toxicity</b>						
AMES toxicity	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
hERG/II inhibitors	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
Skin sensitisation	Yes	No	Yes	Yes	No	Categorical (Yes/No)

Hepatotoxicity	No	No	No	No	No	Categorical (Yes/No)
----------------	----	----	----	----	----	----------------------

**Figure 1. (a)** Time-kill curves of MICs of essential oils from leaves of *C. limon* (CL) and *C. sinensis* (CS) and antifungals amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLC) against *C. albicans* ATCC 90028. **(b)** Spotting of *C. albicans* colonies in SDA after treatment with essential oils, AMB and FLC up to 24h.

**Figure 2.** Effect of essential oils from leaves of *C. limon* and *C. sinensis* on inhibition of adhesion biofilm (a) and eradication of mature biofilm (b) of *C. albicans*. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of crystal violet absorbance values. \*( $p < 0.1$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ) relative to control (without treatment).

**Figure 3.** Biofilm adhesion inhibition and eradication of mature biofilm of *C. albicans* ATCC 90028 strain treated with *C. limon* and *C. sinensis* essential oils and with the antifungals amphotericin B and fluconazole, viewed under a ZEISS Axio Observer inverted light microscope at 400x magnification. Controls (cells untreated).

**Figure 4.** Cytotoxicity effect of *C. limon* [CL], *C. sinensis* [CS], amphotericin B [AMB] and fluconazole [FLC].  $IC_{50}$  values are indicated at the top of the graph. The 95% confidence intervals for the oils were [CL]: 13.17 to 15.53, [CS]: 11.84 to 14.24 [AMB]: 152.7 to 159.4 and [FLC]: 6,377 to 7,886. Results are given in percentages related to untreated control cells. Data are shown as the mean $\pm$ standard deviation values of three replicates measurements.

**Figure 5.** BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and blood-brain barrier

1  
2  
3  
4 permeability of major compounds from the essential oils of the leaves of *C. limon* and *C.*  
5  
6 *sinensis*.  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

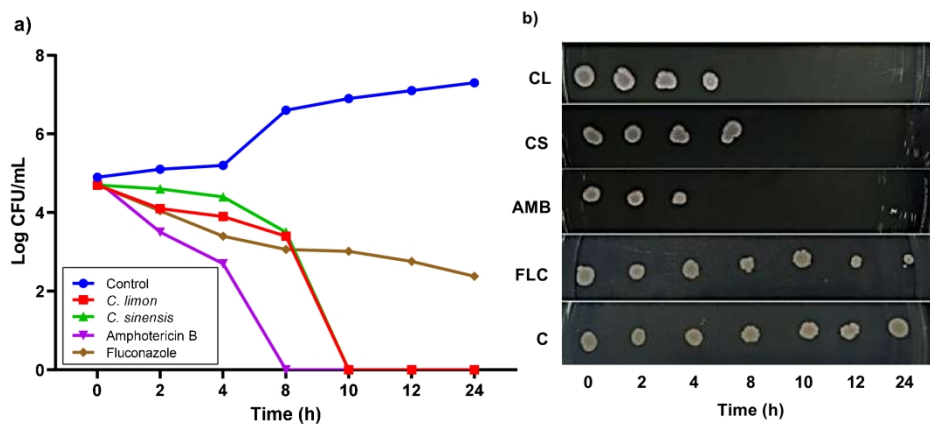
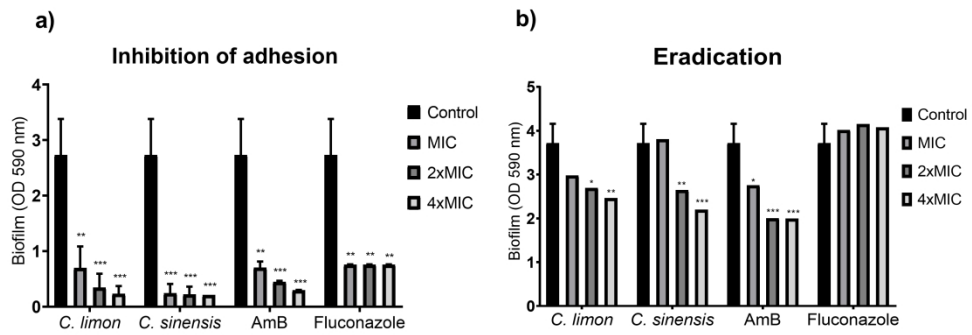


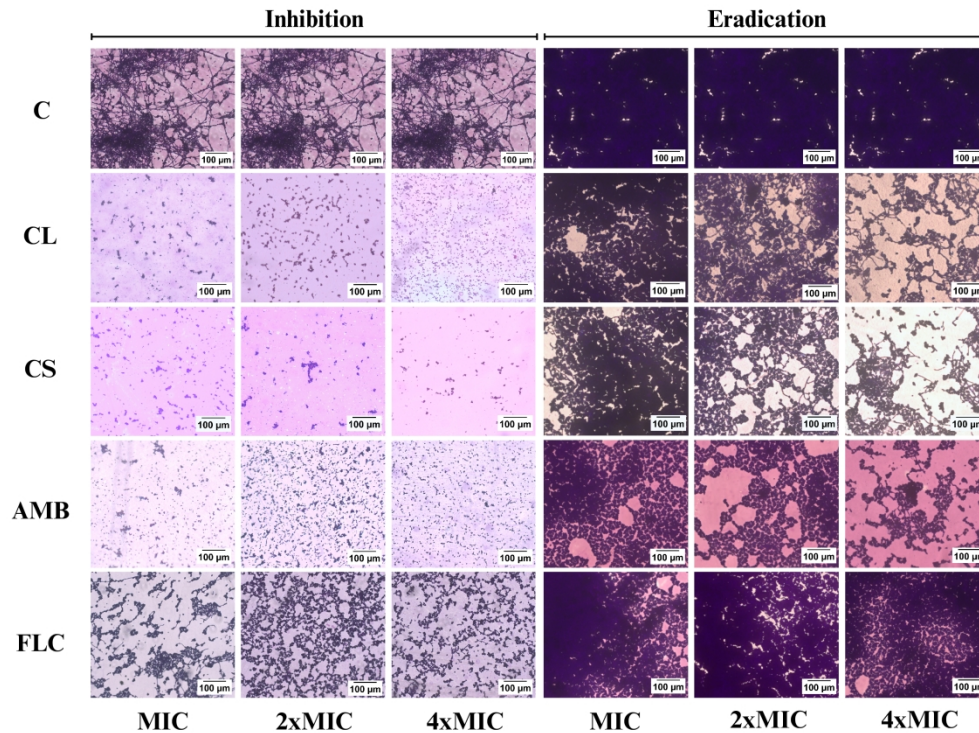
Figure 1. (a) Time-kill curves of MICs of essential oils from leaves of *C. limon* (CL) and *C. sinensis* (CS) and antifungals amphotericin B (AMB) and fluconazole (FLC) against *C. albicans* ATCC 90028. (b) Spotting of *C. albicans* colonies in SDA after treatment with essential oils, AMB and FLC up to 24h.

297x132mm (200 x 200 DPI)



Effect of essential oils from leaves of *C. limon* and *C. sinensis* on inhibition of adhesion biofilm (a) and eradication of mature biofilm (b) of *C. albicans*. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation of crystal violet absorbance values. \*( $p < 0.1$ ), \*\* ( $p < 0.01$ ) and \*\*\* ( $p < 0.001$ ) relative to control (without treatment).

284x104mm (300 x 300 DPI)



31 Figure 3. Biofilm adhesion inhibition and eradication of mature biofilm of *C. albicans* ATCC 90028 strain  
32 treated with *C. limon* and *C. sinensis* essential oils and with the antifungals amphotericin B and fluconazole,  
33 viewed under a ZEISS Axio Observer inverted light microscope at 400x magnification. Controls (cells  
34 untreated).

35 372x275mm (200 x 200 DPI)

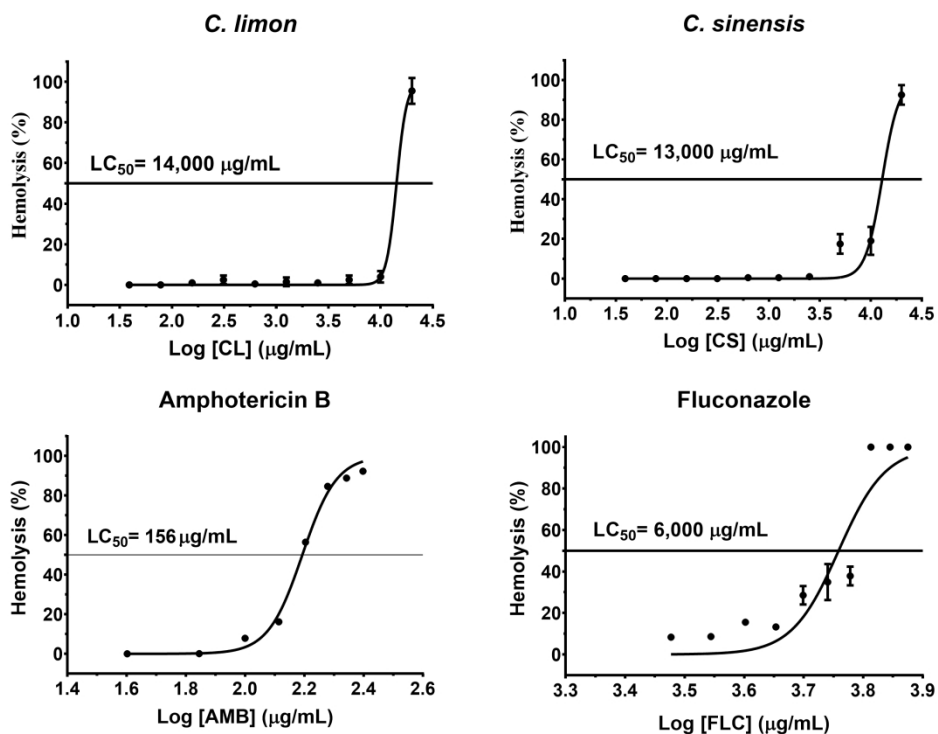


Figure 4. Cytotoxicity effect of *C. limon* [CL], *C. sinensis* [CS], amphotericin B [AMB] and fluconazole [FLC].  $IC_{50}$  values are indicated at the top of the graph. The 95% confidence intervals for the oils were [CL]: 13.17 to 15.53, [CS]: 11.84 to 14.24 [AMB]: 152.7 to 159.4 and [FLC]: 6,377 to 7,886. Results are given in percentages related to untreated control cells. Data are shown as the mean±standard deviation values of three replicates measurements.

257x196mm (300 x 300 DPI)

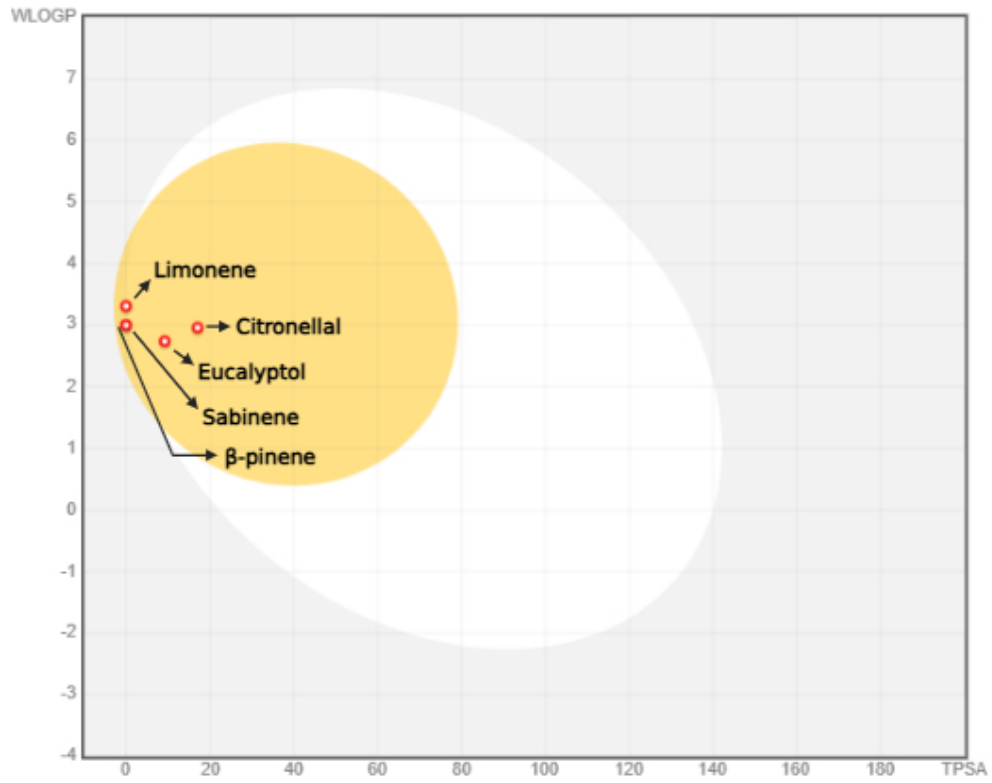


Figure 5. BOILED-Egg to predict gastrointestinal absorption and blood-brain barrier permeability of major compounds from the essential oils of the leaves of *C. limon* and *C. sinensis*.

140x115mm (96 x 96 DPI)