

Zitral, kannabidiol eta laktoferrinaren konbinazioa flukonazolekin *Candida* spp.ak sortutako infekzioak tratatzeko estrategia berri gisa

The use of the combination of citral, cannabidiol and lactoferrin with fluconazole as new strategies for the treatment of infections caused by Candida spp.

Iñigo de-la-Fuente, Andrea Guridi*, Juan Daniel Carton, Esther Tamayo, Iker de-la-Pinta,

Guillermo Quindós, Elena Eraso eta Elena Sevillano

CanBIO Taldea. Mikologia Medikoko laborategia

Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila

Medikuntza eta Erizaintza Fakultatea. UPV/EHU


LABURPENA: Farmakoekiko erresistenteak diren *Candida*ren isolamenduak eragindako kandidiasiarene intzidentziak gora egin du, eta horrek heriotza-tasa handiagoak ekartzeaz gain tratamendu-arazoak inplikatzeko ditu, alternatiba terapeutiko berrien beharra areagotuz. Etorbizun handiko estrategietako bat farmako antifungikoak, hala nola flukonazola, eta berez jarduera antifungikorik erakusten ez duten beste konposatu batzuk konbinatzean datza, efektu sinergikoak lortzeko asmoz. Lan honen helburua flukonazola zitralarekin, kannabidiolarekin eta laktoferrinarekin konbinatzea izan zen, *Candida* espezieen aurka aktibitate antimikrobianoa aztertzeko. Aktibitatea xake-taularen metodoaren bidez ebaluatu zen, eta interakzioa kontzentrazio inhibitzaile zatikatuaren indizea kalkulatu. Konposatu guztiek flukonazolaren kontzentrazio minimo inhibitzailea murriztea lortu zuten, nahiz eta desberdintasunak egon espezieen arabera. Efektu sinergikoak detektatu ziren zitrala eta laktoferrinarekin (*Candida*ren 2 eta 3 isolamendu desberdinetan, hurrenez hurren) eta gehigarria zitralarekin, kannabidiolarekin eta laktoferrinarekin (*Candida*ren isolamendu bakarrean., 2 desberdinetan eta bakarrean, hurrenez hurren).

HITZ GAKOAK: *Candida*; flukonazola; zitrala; kannabidiola; laktoferrina; efektu sinergikoa

ABSTRACT: *The incidence of candidiasis caused by drug-resistant Candida isolates has increased, leading to higher mortality rates and treatment problems that require new therapeutic alternatives. One promising strategy is to combine antifungal drugs, such as fluconazole, with other compounds that do not show antifungal activity on their own in order to achieve synergistic effects. The aim of this work was to combine fluconazole with citral, cannabidiol and lactoferrin to study the antimicrobial activity against Candida species. Activity was assessed by the checkerboard method and interaction by calculating the fractional inhibitory concentration index. All compounds were able to reduce the minimum inhibitory concentration of fluconazole although there were differences between species. Synergistic effects were detected with citral and lactoferrin (in 2 and 3 isolates, respectively) and additive with citral, cannabidiol and lactoferrin (in 1, 2 and 1 isolate, respectively).*

KEYWORDS: *Candida*; fluconazole; citral; cannabidiol; lactoferrin; synergistic effect

1

***Harremanetan jartzeko/ Corresponding author:** Andrea Guridi Cortaberria, CanBIO Ikerketa taldea, Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Saila, Sarriena Auzoa, z/g (48940 Leioa, Bizkaia).  <https://orcid.org/0000-0002-4231-0969>, andrea.guridi@ehu.eus

Nola aipatu / How to ZITE: de-la-Fuente, Iñigo; Guridi, Andrea; Carton, Juan Daniel; Tamayo, Esther; De-la-Pinta, Iker; Quindós, Guillermo; Eraso, Elena; Sevillano, Elena (2024). << Zitral, kannabidiol eta laktoferrinaren konbinazioa flukonazolekin *Candida* spp.ak sortutako infekzioak tratatzeko estrategia berri gisa >>

Jasoa: uztailak 21, 2023; Onartua: otsailak 15, 2024

ISSN 0214-9001-eISSN 2444-3225 / © 2024 UPV/EHU



Obra Creative Commons Atribución 4.0 Internacional-en lizentziapean dago

1. SARRERA

1.1. *Candida* generoa eta kandidiasiak

Candida ondo patogeno oportunistak da, gizakiak pairatzen dituen infekzio fungikoen artean eragile etiologiko nagusia dena (1). *Candida* generoko espezieak mikrobiota gastrointestinalaren, ahokoaren eta baginalaren parte dira, pertsona osasuntsuetan komentsalak direlarik. Mikroorganismo eta ostalariaren arteko oreka apurtzean, hau da, disbiosia ematean, *Candida* generoko espezieak larritasun desberdineko hainbat gaitz sortzeko gai dira. Adierazpen hauen artean azaleko kandidiasiak, larruazalari eta mukosei eragiten dietenak, kandidemiak, eta kandidiasi inbaditzaileak daude. Azken hauek larrienak dira eta tratatzeko zailagoak, heriotza tasa altuago batekin erlazionatuz (2, 3).

Gaur egun, immunogutxipena duten eta zain barneko kateterrak erabiltzen dituzten pazienteen gorakadak, prozedura inbaditzaileen erabilerak, transplanteak eta espektro zabaleko antibiotikoen erabilerak besteak beste, kandidiasi kasuak areagotzen dituzte (4). Kandidiasiak gizakiek pairatzen dituzten mikosi oportunistak ohikoenak dira. Genero honen barruan, nahiz eta 150 espezie baino gehiago deskribatu izan diren, kandidiasiekin maizten erlazionatutako espezieetatik, bost baino ez dira kandidiasi inbaditzaileen % 95a baino gehiagoren eragileak. Boattini *et al*-ek egindako azterlanaren arabera non Europako bost herrialdeetako (Italiako iparralde eta hegoaldea, Portugal, Espainia, Grezia eta Zipre) sei ospitaletan, 2020 eta 2021 urteetan bildutako *Candida* isolamenduak aztertu ziren, espezie nagusia *Candida albicans* (% 45,1) izan zen, ondoren *Candida parapsilosis* konplexua (% 31,8), *Candida glabrata* (% 14,1) *Candida tropicalis* (% 5,4) eta *Candida krusei* (% 2,4) (5). Espezie horietako bakoitzaren intzidentzia kokapen geografikoaren eta pazientearen adinaren eta egoeraren arabera da (6).

*C. parapsilosis*ek eragindako infekzioak areagotu egin dira azkenaldian eta arazo garrantzitsuak dira jaioberrien, transplante-hartzaileen eta elikadura parenteralak jasotzen duten pazienteen artean. Bestalde, *C. glabrata*, ospitaleetan isolatzen diren espezieetatik erresistentzia maila altuena aurkezten duena da, eta ahoko kandidiasien eragile nagusia da, *C. parapsilosis* eta *C. tropicalis*ekin batera. *C. tropicalis* bigarren *Candida* espezie birulentoena kontsideratzen da (7). Horrez gain, *C. krusei* besteak beste, endoftalmitisaren, endokarditisaren eta osteomielitisaren eragileak izan daiteke (8).

Azken urteotan, *Candida auris* espeziearen agerpenak garrantzi berezia hartu du, heriotza-tasa altuekin erlazionatzen dena, % 30-60 ingurukoa (9-11). Bestalde, tratatzeko zailak diren infekzioak eragiten ditu farmako antifungikoekiko berezko erresistentzia azaltzen duelako; bestalde, ospitale-ingurunean luzaroan irauteko gaitasuna dauka(12-16).

1.2. Kandidiasien tratamendua

Kandidiasien tratamendua ezarri aurretik komeni da pazientearen egoera kontuan hartzea eta infekzioan inplikaturako patogenoa behar bezala identifikatzea. Identifikazioa prozesu konplexua da, askotan tratamenduaren aukeraketa zailtzen duena (17). Hala ere, azaleko kandidiasiak tratatzea nahiko erraza da; izan ere, farmako antifungikoak larruzalean edo mukosetan topikoki emanaz gero, mikroorganismoa ezaba daiteke. Kandidiasi inbaditzaileen kasuan, berriz, zailagoa da tratamendu eraginkorra aurkitzea, *Candida* generoko espezieek duten multierresistentzia dela eta (18).

Kandidiasia tratatzeko lau motatako farmakoak erabiltzen dira; polienoak, 5-fluorozitosina, azolak, eta kandinak. B anfoterizina desoxikolatoa, polienoen taldekoa, eta 5-fluorozitosina, pirimidina klase bat, izan ziren 1950-1960 artean infekzio sistemikoen tratamendurako onartutako lehen farmakoak. Hala ere, farmako horien toxikotasuna dela eta, bigarren mailako farmako bihurtu dira. Bestalde, azolen taldea, 1970eko hamarkadaren amaieran sortu zena, talderik handiena da, eta imidazoletan (ketokonazola eta mikonazola) eta triazoletan (isabukonazola, itrakonazola, flukonazola, posakonazola eta borikonazola) banatzen da. Azolek abantaila ugari erakutsi dituzte orain arte dauden farmakoekin alderatuz, segurtasun-profila, onddoen aurkako jarduera eta ezaugarri farmakozinetikoak, hau da, organismoak farmakoarengan duen eragina hobetu baitituzte. Ekinokandinak (kaspofungina, mikafungina eta anidulafungina), antifungiko berrienak dira, 2000. urtearen hasieran onartu zirenak (19).

Azken urteotan, farmako antifungikoekiko erresistenteak diren isolamenduen deskribapena handitzen ari da. Erresistentzien garapen hori azolak edo beste farmako antifungikoak epe luzean hartzearekin erlazionatu da, gaixotasunak prebenitzeko helburuarekin (20, 21). Maizen isolatzen diren espezieen artean, munduko eskualde askotan flukonazola bezalako farmako antifungikoekiko berez erresistenteak diren *C. krusei* anduiak edo haiekiko sentikortasun murriztua duten *C. glabrata* anduiak agertu dira, batez ere azolen erabilera orokorraren eraginez. Flukonazolarekiko erresistentzia intrintsekoa duten, hau da, aurretiko esposiziotik independentea den eta zerikusirik ez duena geneen transferentzia horizontalarekin, beste *Candida* espezie batzuek ekinokandinak bezalako beste agente antifungikoekiko sentikortasuna murriztu egin dute ere, hala nola *Candida guilliermondii* eta estuki lotutako *Candida fermentati* bezalako espezieak, infekzio-kausa ezohikoak izan arren, batzuetan infekzio larriekin lotuta egon daitezkeenak (22).

C. aurisek sortutako kandidiasi inbaditzaileen kontrako tratamendua erronka kliniko garrantzitsua da; izan ere, Ameriketako Estatu Batuetako Gaixotasunen Kontrolerako eta Prebentziorako Zentroak (CDC) erregistratutako andui guztiak batera aztertuta, isolamenduen % 93a flukonazolarekiko erresistentea, % 50a borikonazolarekiko erresistentea, % 35a B anfoterizinarekiko erresistentea eta % 7a ekinokandinekiko erresistenteak zirela ikusi zuten.

Gainera, anduien % 41a bi motatako antifungikoekiko, eta % 4a hiru klaseekiko erresistenteak zirela antzeman zen, arazo terapeutiko garrantzitsua bilakatuz (11, 12, 15, 22).

1.3. Kandidiasiak tratatzeko terapia alternatiboen beharra

Arazo horiek guztiak, *Candida* espezieak eragindako gaixotasunak tratatzeko terapia berritzaileak bilatu behar izatea dakar *de novo* farmakoen garapen prozesu neketsua, luzea eta oso garestia delako. Terapiarik berritzaileenetako bat farmako antifungikoak (flukonazola, adibidez) eta berez efektu antifungikorik ez duten ohiko beste farmako batzuk (ibuprofenoa kasu) konbinatzean oinarritzen da, haien efektu konbinatuak farmako bakoitza bereizita ematen denean ikusten diren efektuen batura baino handiagoak lortzeko asmoz, hau efektu sinergiko modura definitzen da. Estrategia horrek, patogenoarekin modu eraginkorrean amaitzeaz gain, farmako antifungikoak gehiegi eta desegokiro erabiltzea saihesten du, erabilitako dosiak murrizten baititu, tratamenduaren ondorio kaltegarri posibleak eta erresistentziak garatzeko gaitasuna minimizatuz. Gainera, farmako antifungikoak berrerabiltzeko atea irekitzen ditu, konposatu berri bat garatzeak dakarren kostu ekonomiko eta denbora handia saihestuz (11, 23-26).

1.4. Konposatu naturalak

Aktibitate antifungikoa duten konposatu naturalen adibide bat olio esentzialak dira. Olio horietako batzuek eta horien osagaiak jarduera antikandidiasikoa azaldu dute (27, 28). Zitrala landare aromatikoaren osagai aktiboetako bat da, bakterioen eta onddoen aurkako potentzial handia duena. Zitrala (3,7-dimetil-2-6- oktadienala) bi isomero geometrikoak nahastean sortzen den terpenoa da: geraniala edo trans -zitrala eta nerala edo cis -zitrala. Konposatu hau zitrikoen eta beste belar espezieen olio esentzial askotan topa daiteke, hala nola limoia, laranja edo limoi-belarra (28). Duela gutxi, zitralak mintz plasmaticoaren osotasuna suntsitzeko gaitasuna duela deskribatu da, mintza kaltetzen duen mekanismo baten bidez, bere egonkortasuna eta iragazkortasuna arriskuan jarriz (29). Zitralaren itua, batez ere mintz zelular fungikoa da, bere sintesia blokeatuz eta egituran eraginez, azkenik, heriotza zelularra bideratuz. Esporen erretzea, ugaritzea eta arnasketa zelularra ere eragozten ditu (30).

Beste konposatu natural bat landare-aterakinetatik lortutako kannabidiola (CBD) da. Fitokannabinoide ez-psikoaktiboa da, *Cannabis sativa* landareak sortzen duena eta gizakiengan ondo onartzen dela frogatu dena. CBDak propietate ezberdinak ditu eta hainbat gaixotasunen tratamenduan eraginkorra dela deskribatu da, hala nola gaixotasun inflamatorioak, neurodegeneratiboak, autoimmuneak, kardiobaskularrak eta minbiziaren tratamenduan (31). Zenbait ikerketek ere frogatu dute CBDak mikroorganismoen aurkako jarduera duela. *C. sativaren*

estraktuek jarduera antimikrobianoa erakutsi zuten bakterio grampositiboetan zein gramnegatiboetan eta baita onddo batzuetan ere, hala nola *Aspergillus niger* onddoan (32). Frogatu denez ere, CBDak metizilinarekiko erresistentea den *Staphylococcus aureusen* (MRSA) aurkako jarduera antimikrobiano indartsua aurkeztu du (33).

Aukera interesgarri bat azaltzen duen konposatu naturalen beste adibide bat laktoferrina da, giza zelula epitelialetan jariatzen den glikoproteina, eta esnea, malakoak edo listua bezalako fluidoetan dagoena. Laktoferrinak hainbat funtzio fisiologikotan parte hartzen du, hala nola burdinaren homeostasian eta ostalariaren defentsan. Gainera, laktoferrinak ezaugarri antimikrobianoak, antiinflamatorioak, antioxidatzaileak eta minbiziaren aurkako propietateak ditu (34, 35). Hasieran, laktoferrinaren jarduera antimikrobianoa burdina bahitzeko zuen gaitasunarekin erlazionatu bazen ere, duela gutxi egindako azterketen arabera, laktoferrinaren mekanismo antifungiko nagusia burdinarekiko independentea dela erakutsi dute, eta elkarrekintza hori proteina horrek mikroorganismoen zelula-gainazalarekin duen zuzeneko kontaktuaren bidez gertatzen dela deskribatu da. Horrek aldaketak eragiten ditu zelula-mintzaren iragazkortasunean, eta zelula-heriotza eragiten du (36, 37). Laktoferrinak bakterioen aurkako defentsan duen papera ondo dokumentatuta badago ere, jarduera antifungikoa onddo batzuen aurrean soilik aztertu da, hala nola *Aspergillus*, *Cryptococcus* eta *Candida* espezie gutxi batzuen aurrean (37, 38).

2. HELBURUAK

Farmako antifungikoekiko erresistenteak diren *Candida* espezie batzuek sortutako kandidiasi inbaditzaileen tratamendua erronka klinikoa da gaur egun, eta estrategia terapeutiko berriak bilatzea behar du.

Horregatik guztiagatik, lan honen helburuak hurrengoak izan ziren:

- Monoterapien zitralaren, CBDaren eta laktoferrinaren *in vitro* efektu antifungikoaren azterketa *Candida* espezie desberdinen kontra.
- Flukonazola eta jatorri naturaleko konposatuen konbinazioen *in vitro* sentikortasuna aztertzea hautatutako isolamenduen aurka, salda bidezko mikrodiluzioaren erreferentzia-teknikaren eta xake-taularen metodoaren bidez.
- Konbinazioen jarduera gehigarria edo sinergikoa aztertzea eta konposatuek flukonazolaren potentzia antifungikoan duten eragina baloratzea.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

Ikerketa hau UPV/EHUko Medikuntza eta Erizaintza Fakultateko Immunologia, Mikrobiologia eta Parasitologia Sailean egin zen. Lan esperimentalak 2. arrisku biologikoko taldeko mikroorganismoekin egin zen C2 segurtasun maila ziurtatuta zuten laborategietan. Horrez gain,

taldeak Agente Biologikoekin eta Transgenikoekin ikertzeko Etika Batzordearen (UPV/EHU CEIAB) oniritzia du; M30_2022_377 eta M30_2015_248 erreferentzia-zenbakiekin ziurtatua.

3.1. Anduiak

Konbinazioen eragina bost *Candida* espezieen isolamenduen aurrean aztertu zen: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. auris* eta *C. parapsilosis*.

Isolamenduak ur destilatu esterileko hodietan mantendu ziren giro-tenperaturan, eta Sabouraud glukosadun agar plaketan (Scharlab, Espainia) 4 °C-tan. Inokuluak lortzeko, anduiak Sabouraud agar plaketan erein ziren eta 24 orduz inkubatu ziren 37 °C-tan.

3.2. Aztertutako farmako eta konposatuak

Erabili zen farmako antifungikoa flukonazola (FLZ) (Pfizer SA, Espainia) izan zen, eta honako produktu natural hauekin konbinatu zen: kannabidiola (CBD) (Signature products, GmbH, Alemania), laktoferrina (LF) (Sigma-Aldrich, AEB) eta zitrala (ZIT) (Sigma Aldrich).

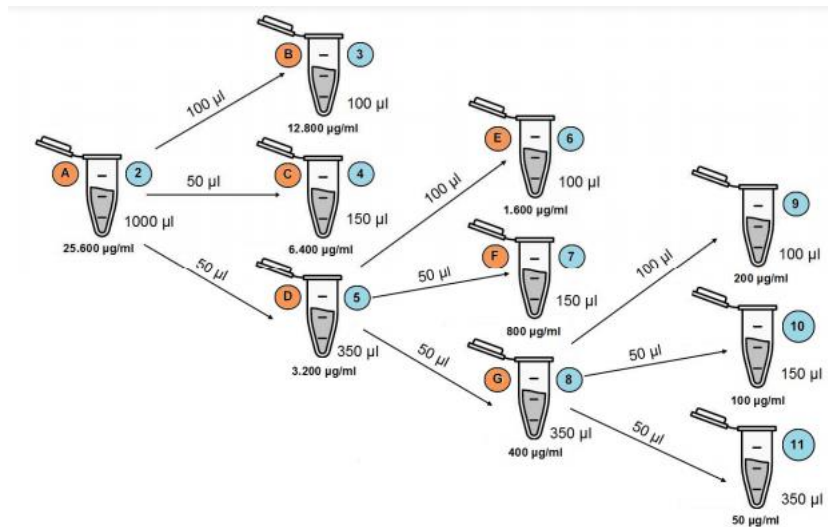
3.3. Sentikortasunaren azterketa

Candida isolamenduek farmako antifungikoekiko duten *in vitro* sentikortasuna aztertu zen kontzentrazio minimo inhibitzailea (CMI) zehaztuz. CMIa hazkundera inhibitzen duen antifungiko baten kontzentrazio txikiena da ($\mu\text{g/mL}$ -tan) eta organismoak antifungikoarekiko duen sentikortasun edo erresistentziari buruzko informazioa ematen du. Horretarako, *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) batzordeak gomendatutako metodoaren “EDef 7.3.2” dokumentuan deskribatutako prozedura estandarizatua hartu zen erreferentziatzat (39).

Farmakoen konbinazioak EUCASTen jarraibideak jarraituz, xake-taulako saiakuntza izeneko metodoa erabiliz aztertu ziren.

3.3.1. Farmakoen diluzioen eta konposatuen prestaketa

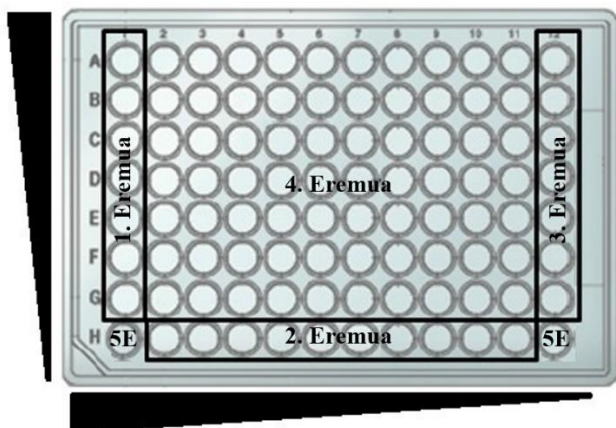
Aزتutako farmakoen kontzentrazio-tartea honakoa izan zen: CBDarena 1 eta 512 $\mu\text{g/mL}$ artekoa; flukonazolarena 1 eta 64 $\mu\text{g/mL}$ artekoa; laktoferrinarena 0,06 eta 32 $\mu\text{g/mL}$ artekoa eta zitralarena 2 eta 1024 $\mu\text{g/mL}$ artekoa. Konposatu bakoitzaren hasierako kontzentrazio soluzioa prestatu zen, probatu beharreko konposatuaren kontzentrazio altuena baino 400 aldiz handiagoa den kontzentrazioarekin. Horretarako, konposatu bakoitza dimetilsulfosidoan (DMSO, Sigma-Aldrich) disolbatu zen, eta kontzentrazio-gradiente diluzio bikoitz seriatuaren bidez prestatu zen, betiere DMSO disolbatzaile gisa erabiliz, **1. Irudian** azaltzen den bezala.



- 1. Irudia.** Diluzio bikoitz seriatoen eskema. Zirkuluen barruan agertzen diren letrak eta zenbakiak bat datoz diluzio bakoitza banatu zen xake-taulako plakaren lerro eta zutabeekin, hurrenez hurren.

3.3.2. Mikroplaken prestaketa

Rosewell Park Memorial Institute (RPMI 1640, Sigma-Aldrich) erabili zen hazkuntza-medio gisa, L-arginina eta % 2 glukosa dituen, 0,165 M azido morfolino propano sulfoniko (MOPS, Sigma-Aldrich) tanponatua. Bestalde, pH-a $7,0 \pm 0,1$ era doitu zen, iragazki bidez esterilizatu zen eta $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan biltegitatu zen erabili arte. **1. Irudiko** diluzio seriato bakoitzaren edukia 1:100 proportzioan disolbatu zen RPMIdun hodi desberdinetan. Diluzio berri horiekin 96 putzutxoko poliestirenozko mikroplaka esterilak osatu ziren, kontzentrazioen gradiente bikoitza lortzeko **2. Irudian** azaltzen den bezala. Horrela, A1-A11 zutabeen farmako baten kontzentrazio desberdin guztiak daude, G1-G11 lerroan beste konposatuaren kontzentrazio desberdinak, eta 4. eremuan konbinazioak daude kontzentrazio-gradiente desberdinetan. H1 eta H12 putzutxoak esterilizazio-kontrol gisa erabiltzen ziren, eta A12 -G12 zutabea hazkunde-kontrol gisa. Behin mikroplaka bakoitza prestatuta, $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan izoztu ziren saiakuntza egunera arte.



2. Irudia. Farmakoen kontzentrazioen banaketaren eskema. 1. eremuan, behetik gorako kontzentrazio-gradiente bati jarraituz lerroan farmakoetako bat gehitzen da; gure kasuan, flukonazola. 2. eremuan beste konposatu natural desberdinak gehitzen dira, eskuinetik ezkerreara kontzentrazio-gradiente bat duten zutabeetan banatutako flukonazolekin konbinatuko direnak. 3. eremuan: hazkuntza-kontrola. 4. eremua: farmako eta konposatu naturalen arteko konbinazioak kontzentrazio-gradientearen. 5. eremuan: esterilitate-kontrola.

3.3.3. Inokuluaren prestaketa

Entsegua egin baino 24 ordu lehenago, *Candida* isolamenduak Sabouraud agar plaketan inokulatu ziren 37 °C-tan eta ondoren, kultura bakoitzeko kolonia batzuk ur destilatuan eseki ziren. Esekidurak 0,5 McFarland-eko zelula-dentsitatez egokitu ziren, $1-5 \times 10^6$ UKE/mL-ko (unitate kolonia eratzailea/mL) legamia-kontzentrazioari dagokiona. Esekidura hauetatik, ur destilatu esterilean diluzio hamartar bat egin zen $0,5-2,5 \times 10^5$ UKE/mL-ko azken inokulua lortzeko. Behin inokuluak lortuta, aurretik desizoztutako mikroplakak inokulatu ziren. Putzutxo guztietan, dagokion inokuluaren 100 μ L gehitu ziren, **2. Irudiko** H1 eta H12 putzuetan (esterilitate-kontrola) izan ezik; horietan, 100 μ L ur destilatu gehitu ziren. Azkenik, plakak 37 °C-tan inkubatu ziren 24-48 orduz. Entsegu guztietan *C. parapsilosis* ATCC 22019 anduia erabili zen teknikaren kalitate-kontrol gisa.

3.3.4. Plakak irakurketa eta emaitzen interpretazioa

Mikroplakak 24 eta 48 ordutan irakurri ziren, putzu bakoitzaren absorbantzia-balioa neurtuz plaka irakurgailu batekin (Tecan Infinite F50, Suitza) 450 nm-ko uhin luzeran. Zuriaren balioa (esterilitate-kontrola, H1 eta H12 putzuak) gainerako putzuen irakurketei kendu zitzaizkien. Hori dela eta, farmako edo konposatu desberdinekin lortutako absorbantziak bildu eta *Candida* isolamendu desberdinekiko zuten CMIak kalkulatu ziren.

Konbinazioen emaitzak Loeweren gehigarritasunaren eredua jarraituz aztertu ziren. Ereduez-parametrikoko hori FICIn oinarritzen da, hau da, kontzentrazio inhibitzailearen indize zatikatuan. Indize hori farmako bakoitzaren CMI gisa definitzen da, konbinazioan jarduten duenean, farmakoarekin bakarrik jarduten duenean CMIarekin zatituta. Horrela, interakzio farmakologikoak honela sailkatzen dira: sinergikoak ($FICI < 0,5$), gehigarriak ($FICI \geq 0,5$ baina < 1), indiferenteak ($FICI \geq 1$ baina < 4) edo antagonikoak ($FICI \geq 4$) (40, 41).

$$FICI = \frac{\text{Konposatu Aren CMIA konbinatuta}}{\text{Konposatu Aren CMIA bakarrik}} + \frac{\text{Konposatu Bren CMIA konbinatuta}}{\text{Konposatu Bren CMIA bakarrik}}$$

4. EMAITZAK

In vitro sentikortasun-azterketak egin ondoren zitrala, CBDa eta laktoferrina flukonazolarekin konbinatzean, emaitza positiboak izan ziren, konposatu guztiekin efektu sinergiko eta gehigarria lortuz.

4.1. Zitral eta flukonazolaren kontrako sentikortasuna

Monoterapiaren, flukonazolaren CMIA $1 - >64 \mu\text{g/mL}$ artekoa izan zen eta zitralaren CMIA $256-1024 \mu\text{g/mL}$ artekoa (**2. taula**). Isolamenduen % 40ak flukonazolarekiko erresistentzia erakutsi zuten, $64 \mu\text{g/mL}$ -tik gorako CMI balioekin. Bi konposatuen arteko konbinazioak flukonazolaren CMIA sei aldiz baino gehiago murriztea lortu zuen bi isolamenduen aurrean ($>64 \mu\text{g/mL}$ tik $1 \mu\text{g/mL}$ ra), *C. krusei* eta *C. auris* espezieetan zehazki. Zitralaren CMIA, berriz, $256-1024 \mu\text{g/mL}$ tik $128 \mu\text{g/mL}$ ra murriztu zen kasu guztietan. Ondorioz, flukonazola zitralarekin konbinatzearen efektuak monoterapia bidezko tratamenduaren eragina hobetu zuen. Hala ere, *C. albicans* espeziearen kasuan, zitralak ez zuen flukonazolaren CMIA murriztea lortu.

FICIn emaitzak aztertzerakoan erlazio sinergikoa lortu zen isolamenduen % 40an (*C. auris* eta *C. glabrata* espezieetan) eta efektu gehigarria isolamenduen % 20an (*C. krusei* espeziean).

2. Taula. Zitral (ZIT) eta flukonazol (FLZ) jarduera *Candida* isolamenduen aurrean.

CMI ($\mu\text{g/mL}$)

Monoterapia	Konbinazioa
-------------	-------------

Anduiak	FLZ		ZIT		FICI	Interpretazioa
	FLZ	ZIT	FLZ	ZIT		
<i>C. albicans</i> SC5314	1	256	1	128	1,50	IND
<i>C. glabrata</i> UPV 15-004	16	512	1	128	0,31	SIN
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	64	256	1	128	0,51	GEHI
<i>C. auris</i> UPV 18-261	>64	1024	1	128	0,07	SIN
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2	256	1	128	1	IND

FICI: kontzentrazio inhibitzaile zatikatuaren indizea; SIN: interakzio sinergikoa; GEHI: interakzio gehigarria; IND: interakzio indiferentea.

4.2. CBD eta flukonazolaren kontrako sentikortasuna

Aztertutako isolamenduen kontra flukonazolaren CMIa 1- >64 µg/mL artekoa izan zen, eta CBDaren CMIa, berriz, monoterapiari, 4 - > 512 µg/mLkoa (**3. Taula**). Konbinazioan lortutako emaitzak aztertuta, flukonazolaren CMIa 1-16 µg/mL-ko kontzentrazioetara murriztu zen isolamenduen % 40an. Bestalde, CBDren CMIaren murrizketa nabarmena ikusi zen lau isolamenduetan non CMIa 2, 2, 7 eta 9 aldiz gutxitu zen monoterapiako CMIarekin alderatuta, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei* eta *C. parapsilosis* espezieetan, hurrenez hurren. Hala ere, CBDa ez zen eraginkorra izan flukonazolaren CMIa murriztean, *C. albicans*, *C. auris* eta *C. parapsilosis* espezieen kontra.

Emaitzak FICI ereduarekin interpretatzean, efektu gehigarria lortu zen isolamenduen % 40an, *C. glabrata* eta *C. krusei* espezieetan.

3. Taula. Kannabidiol (CBD) eta flukonazola (FLZ) jarduera *Candida* isolamenduen aurrean.

Anduiak	CMI (µg/mL)				FICI	Interpretazioa
	Monoterapia		Konbinazioa			
	FLZ	CBD	FLZ	CBD		
<i>C. albicans</i> SC 5314	1	> 512	1	128	1,12	IND
<i>C. glabrata</i> UPV 17 - 236	2	4	1	1	0,75	GEHI
<i>C. krusei</i> ATCC 6258	32	512	16	4	0,51	GEHI
<i>C. auris</i> UPV 22 - 100	> 64	> 512	>64	> 512	2	IND
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	2	> 512	2	1	1,01	IND

FICI: kontzentrazio inhibitzaile zatikatuaren indizea; SIN: interakzio sinergikoa; GEHI: interakzio gehigarria; IND: interakzio indiferentea.

4.3. Laktoferrina eta flukonazolaren kontrako sentikortasuna

Laktoferrina eta flukonazolaren konbinazioari dagokionez, isolamendu guztiek flukonazolarekiko erresistentzia erakutsi zuten, monoterapiari, CMIko 64 µg/mL-tik gorako balioekin (**4. Taula**).

Bestalde, monoterapiako laktoferrinaren CMIak 16-> 32 µg/mL tartekoak izan ziren. Nabarmentzekoa da flukonazolaren eta laktoferrinaren arteko konbinazioak murriztu egin zuela flukonazolaren CMIa, > 64 µg/mL-tik 32-8 µg /mL-ra 4 isolamenduen aurrean (*C. auris* espeziarena izan ezik). Laktoferrinako CMIak, berriz, 16 ->32 µg/mL-tik 0,12 - 16 µg/mL-raino murriztu ziren lau isolamenduen aurrean (*C. auris* espeziarena izan ezik).

FICI ereduak emaitza horiek sinergikotzat eman zituen, isolamenduen % 60aren aurrean (*C. albicans*, *C. glabrata* eta *C. parapsilosis* espezieetan) eta gehigarritzat % 20aren aurrean (*C. krusei*).

4. Taula. Laktoferrina (LF) eta flukonazola (FLZ) jarduera *Candida* isolamenduen aurrean.

CMI (µg/mL)

Anduiak	Monoterapia		Konbinazioa		FICI	Interpretazioa
	FLZ	LF	FLZ	LF		
<i>C. albicans</i> UPV 15-154	>64	>32	8	16	0,25	SIN
<i>C. glabrata</i> UPV 15-202	64	>32	8	16	0,38	SIN
<i>C. krusei</i> UPV 03-263	64	16	32	0.12	0,51	GEHI
<i>C. auris</i> UPV 17-261	>64	>32	>64	>32	2	IND
<i>C. parapsilosis</i> NCPF 3104	>64	32	16	8	0,38	SIN

FICI: kontzentrazio inhibitzaile zatikatuaren indizea; SIN: interakzio sinergikoa; GEHI: interakzio gehigarria; IND: interakzio indiferentea.

5. EZTABAIDA

C. aurisek edo antifungikoekiko erresistenteak diren beste *Candida* espezie batzuek eragindako kandidiasi inbaditzailearen tratamenduak erronka klinikoa suposatzen du, estrategia terapeutiko berriak bilatzea eskatzen duena. Hauen artean, emaitza esperantzagarriak eman dituen alternatiba bat farmako antifungikoak beste konposatu batzuekin eta izaera desberdineko farmakoekin konbinatzean datza, efektu sinergikoak bilatzeko asmoz, antifungiko horrekiko erresistentzia gainditzeko. Ikerketa honetan flukonazola erabili zen, kandidiasia tratatzeko asko erabili den kostu txikiko farmakoa delako. Antifungiko honekin konbinatu ahal den produktu bat aurkitzea, haren eraginkortasuna hobetzeko asmoz, oso garrantzitsua izango litzateke, aurkikuntza horrek isolamendu erresistenteen aurka erabiltzea ahalbidetuko lukeelako.

Lan honetan zitralaren eragina aztertu genuen. Molekula hau zenbait landareetan biologikoki aktiboa den konposatua da eta C₁₀H₁₆O formula molekularra duten isoprenozko bi unitatez osatua dago. Zitrala, geraniala eta nerala deritzen bi isomero geometrikoren nahasketa batek jasotzen duen izena da. Zitralaren propietate antimikrobianoak frogatuak izan dira *Alternaria alternata*, *Aspergillus ochraceus* edo *Penicillium expansum* bezalako onddoen aurka edo *Staphylococcus*

aureus edo *Escherichia coli* bezalako bakterioen aurka (42-46). Lan honen aurkikuntza nagusietako bat zitralak *in vitro* esperimenduetan erakutsitako efektu antifungikoa izan da, kasu askotan monoterapiako farmako antifungikoen aktibitatearen antzekoa zena.

Bestalde, flukonazolaren eta zitralaren konbinazioa sinergikoa zela erakutsi zen aztertutako bi anduietan, *C. auris* eta *C. glabrata* espezieetan eta gehigarria *C. krusei* hain zuzen. Gainera, azpimarratu behar da antifungikoaren CMIa murrizten zela zitralarekin konbinatuta erabiltzen zenean, 6 diluzio baino gehiago *C. auris*en kasuan eta 4 diluzio *C. glabrata*ren kasuan. *C. auris* erresistenteen isolamenduen kasuak ugaritu egin direnez, alternatiba hori eskuragarri edukitzea *C. auris*ek eragindako kandidiasiaren aurkako tratamendu-aukera baimendu dezake; izan ere, alde batetik flukonazola bezalako antifungiko merkea, segurua eta administratzeko erraza isolamendu erresistenteen aurka erabiltzen jarraitzeko aukera ematen du. Bestetik, efektu sinergikoa indartzeaz gain, flukonazolaren CMIa murrizteak farmako hau dosi txikiagoetan erabil daitekeela suposatzen du, isolamendu erresistenteen agerpena saihestuz. Zitralaren eragina beste espezie batzuen kontra ere eraginkorra zela ikusi zuten Miranda-Cadena *et al.*-ek egindako azterlanean, non konposatu honek *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* eta *C. tropicalis* anduien kontra ahalmen antimikrobianoa azaldu zuen (47).

Bestalde, lan honetan flukonazola CBDarekin konbinatu zen. Kannabidiola, *Cannabis sativa* landareak ekoiztutako konposatu ez-psikoaktiboa da. Gero eta froga gehiagok iradokitzen dute kannabinoideak onuragarriak direla gaitz kliniko batzuetarako, hala nola mina, hantura, epilepsia, loaren nahasmenduan, esklerosi anizkoitzaren sintoman, anorexia eta eskizofrenian, besteak beste (48). Kanabisarekin lotutako produktuen artean, kannabidiola da gehien aztertzen denetako bat, honek duen potentzial terapeutikoagatik. Orain arte gutxi dira argitaratu izan diren artikulua non CBDaren ahalmen antimikrobianoa aztertu den, eta hauetatik gehienak bakterioetan zentratzen dira. Blaskovich *et al.*-ek 2021.urtean argitaratutako artikuluan CBDa eraginkorra zela hainbat bakterio grampositibo eta gramnegatiboen kontra ikusi zuten (49).

Ikerketa honetan, flukonazola CBDarekin konbinatzean, bi efektu gehigarri lortu ziren *C. krusei* eta *C. glabrata* anduien kontra. Feldman *et al.*-ek egindako ikerketan (50), CBDak batez ere *C. albicans*-en biofilmaren eraketan duela eragina ziurtatzen dute, eta ez hainbeste onddoaren hazkunde planktonikoan. Emaitza hauek kontuan edukita interesgarria izango litzateke esperimendu gehiago egitea CBDak bi espezie hauek sortutako biofilmen eraketa ere oztopatzeko gai den aztertzeko. *Candida* biofilmak eratzen hazten denean erresistenteago bihurtzen denez, *Candida*ren biofilmen sorkuntza inhibitzeko aukera terapeutiko bat edukitzea oso garrantzitsua izango litzateke *Candida*rengatiko infekzioak saihesteko. Gainera, *Candida* ospitaleko gainazal desberdinetan biofilm moduan hazten denean infekzio foku konstante moduan jokatzen duenez, oso interesgarria izango litzateke CBDaren ahalmen desinfektatzailea gainazal desberdinetan ikertzea.

Azkenik, lan honetan laktoferrinaren ekintza antimikrobianoa aztertu zen. Laktoferrina burdina finkatzen duen glukoproteina da, transferrinaren familiakoa. Konposatu hau esnean, malkoetan, listuan eta gorputz jario exokrino gehienetan agertzen da. Laktoferrinak efektu antifungikoa erakutsi du *Candida* espezie desberdinen aurrean, burdina bahitzeko ahalmenagatik, zelula-barneko kaltzio erreserbak askatzeko duen gaitasunagatik eta zelulen gainazalaren iragazkortasuna aldatzeagatik (36, 37, 51).

Azterlan honetan lortutako emaitzek erakusten zutenez, flukonazola eta laktoferrinaren arteko konbinazioak flukonazolaren CMIa murriztu zuen isolamenduen % 80an eta hiru espezieetan (*C. albicans*, *C. glabrata* eta *C. parapsilosis*) efektu sinergikoa lortu zen. Emaitza hauek bat datoz Lahoz *et al.*-ek lortutako emaitzekin, zeinetan flukonazolaren eta laktoferrinaren arteko konbinazioak sinergismo handia erakutsi zuten flukonazolekiko sentikorrek diren *C. albicans* isolamenduen aurrean, baita Wakabayasi H. *et al.*-ek egindako lanean, non flukonazolaren CMIa murrizten zen isolamenduen % 73an (51, 52). Kobayashi *et al.*-ek lortutako emaitzek flukonazolaren eta laktoferrinaren konbinazioaren jardura sinergikoa flukonazolekiko sentikortasunaren eta isolatuen erresistentzia-mekanismoen araberakoa zela adierazi zuten (53).

Lan honen ondorio bezala, flukonazola produktu naturalekin konbinatzeak emaitza interesgarriak erakutsi zituen aztertutako *Candida* isolamendu klinikoan aurreko sentikortasun-azterketetan, efektu sinergikoak eta gehigarriak aurkitu baitziren. Produktu naturalen erabilerak flukonazolaren CMIa murrizten lagundu zuten kasu askotan. Konposatu horren segurtasuna bermatzeko zیتotoxicotasun-saiakuntza gehiago beharko liratekeen arren, emaitza hauek oso esperantzagarriak dira, batez ere *C. auris* eta beste espezie erresistenteek eragindako infekzioen tratamendua erronka klinikoa baita gaur egun.

ESKER ONAK

CanBIO ikerketa-taldeak Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Unibertsitate eta Ikerketa Sailak (GIC IT-1607-22) eta Zientzia eta Berrikuntza Ministerioak (PID2020-117983RB-I00) finantziazioa jaso du.

6. BIBLIOGRAFIA

[1] KREULEN IAM, DE JONGE WJ, VAN DEN WIJNGAARD, RENÉ M., VAN THIEL, ISABELLE A. M. 2023.«*Candida* spp. in Human Intestinal Health and Disease: More than a Gut Feeling». *Mycopathologia* **188**:845-862. 10.1007/s11046-023-00743-z.

[2] QUINDÓS G, MARCOS-ARIAS C, SAN-MILLÁN R, MATEO E, ERASO E. 2018.«The continuous changes in the aetiology and epidemiology of invasive candidiasis: from familiar *Candida albicans* to multiresistant *Candida auris*». *International Microbiology* **21**:107-119.

- [3] BARANTSEVICH N, BARANTSEVICH E. 2022.«Diagnosis and Treatment of Invasive Candidiasis». *Antibiotics (Basel)* **11**:718. 10.3390/antibiotics11060718.
- [4] ORTEGA M, MARCO F, SORIANO A, ALMELA M, MARTÍNEZ JA, LÓPEZ J, PITART C, MENSA J. 2011.«*Candida* species bloodstream infection: epidemiology and outcome in a single institution from 1991 to 2008». *The Journal of hospital infection* **77**:157-161. 10.1016/j.jhin.2010.09.026.
- [5] BOATTINI M, PINTO MF, CHRISTAKI E, FASCIANA T, FALCES-ROMERO I, TOFARIDES A, BIANCO G, CENDEJAS-BUENO E, TRICOLI MR, TSIOLAKKIS G. 2023.«Multicentre Surveillance of *Candida* Species from Blood Cultures during the SARS-CoV-2 Pandemic in Southern Europe (CANCoVEU Project)». *Microorganisms* **11**:560.
- [6] BOAN P, GARDAM D. 2019.«Epidemiology and antifungal susceptibility patterns of candidemia from a tertiary centre in Western Australia». *Journal of Chemotherapy* **31**:137. 10.1080/1120009x.2019.1595895.
- [7] PRISTOV KE, GHANNOUM MA. 2019.«Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide». *Clinical Microbiology and Infection* **25**:792-798.
- [8] JAMIU AT, ALBERTYN J, SEBOLAI OM, POHL CH. 2021.«Update on *Candida krusei*, a potential multidrug-resistant pathogen». *Medical mycology* **59**:14-30.
- [9] ARENDRUP MC, PATTERSON TF. 2017.«Multidrug-Resistant *Candida*: Epidemiology, Molecular Mechanisms, and Treatment». *The Journal of infectious diseases* **216**:S445-S451. 10.1093/infdis/jix131.
- [10] PAPPAS PG, REX JH, LEE J, HAMILL RJ, LARSEN RA, POWDERLY W, KAUFFMAN CA, HYSLOP N, MANGINO JE, CHAPMAN S, HOROWITZ HW, EDWARDS JE, DISMUKES WE. 2003.«A Prospective Observational Study of Candidemia: Epidemiology, Therapy, and Influences on Mortality in Hospitalized Adult and Pediatric Patients». *Clinical Infectious Diseases* **37**:634-643. 10.1086/376906.
- [11] JEFFERY-SMITH A, TAORI SK, SCHELENZ S, JEFFERY K, JOHNSON EM, BORMAN A, MANUEL R, BROWN CS. 2018.«*Candida auris*: a Review of the Literature». *Clinical microbiology reviews* **31**:. 10.1128/CMR.00029-17.
- [12] CHOWDHARY A, SHARMA C, MEIS JF. 2017.«*Candida auris*: A rapidly emerging cause of hospital-acquired multidrug-resistant fungal infections globally». *PLoS Pathogens* **13**:1-10. 10.1371/journal.ppat.1006290.
- [13] LOCKHART SR, ETIENNE KA, VALLABHANENI S, FAROOQI J, CHOWDHARY A, GOVENDER NP, COLOMBO AL, CALVO B, CUOMO CA, DESJARDINS CA, BERKOW EL, CASTANHEIRA M, MAGOBO RE, JABEEN K, ASGHAR RJ, MEIS JF, JACKSON B, CHILLER T, LITVINTSEVA AP. 2017.«Simultaneous Emergence of Multidrug-Resistant *Candida auris* on 3 Continents Confirmed by Whole-Genome Sequencing and Epidemiological Analyses». *Clinical infectious diseases* **64**:134-140. 10.1093/cid/ciw691.
- [14] VALLABHANENI S, KALLEN A, TSAY S, CHOW N, WELSH R, KERINS J, KEMBLE SK, PACILLI M, BLACK SR, LANDON E, RIDGWAY J, PALMORE TN, ZELZANY A, ADAMS EH,

QUINN M, CHATURVEDI S, GREENKO J, FERNANDEZ R, SOUTHWICK K, FURUYA EY, CALFEE DP, HAMULA C, PATEL G, BARRETT P, LAFARO P, BERKOW EL, MOULTON-MEISSNER H, NOBLE-WANG J, FAGAN RP, JACKSON BR, LOCKHART SR, LITVINTSEVA AP, CHILLER TM. 2017.«Investigation of the First Seven Reported Cases of *Candida auris*, a Globally Emerging Invasive, Multidrug-Resistant Fungus—United States, May 2013–August 2016». *American journal of transplantation* **17**:296-299. 10.1111/ajt.14121.

[15] MCCARTHY, KONTOYIANNIS, CORNELLY, PERFECT, WALSH. 2017.«Novel Agents and Drug Targets to Meet the Challenges of Resistant Fungi». *The Journal of infectious diseases* **216**:S474-S483. 10.1093/infdis/jix130.

[16] RUIZ-GAITÁN A, MORET AM, TASIAS-PITARCH M, ALEIXANE-LÓPEZ AI, MARTÍNEZ-MOREL H, CALABUIG E, SALAVERT-LLETÍ M, RAMÍREZ P, LÓPEZ-HONTANGAS JL, HAGEN F, MEIS JF, MOLLAR-MASERES J, PEMÁN J. 2018.«An outbreak due to *Candida auris* with prolonged colonisation and candidaemia in a tertiary care European hospital». *Mycoses* **61**:498-505. 10.1111/myc.12781.

[17] KULLBERG BJ, ARENDRUP MC. 2015.«Invasive candidiasis». *N Engl J Med* **373**:1445-1456.

[18] BASSETTI M, GIACOBBE DR, VENA A, WOLFF M. 2019. Diagnosis and treatment of candidemia in the intensive care unit, p 524-539. In Anonymous Seminars in respiratory and critical care medicine. Thieme Medical Publishers.

[19] PERFECT JR. 2017.«The antifungal pipeline: a reality check». *Nature reviews Drug discovery* **16**:603-616.

[20] WESTBROOK S, KIRKPATRICK W, FREYTES C, TORO J, BERNARDO S, PATTERSON T, REDDING S, LEE S. 2007.«*Candida krusei* sepsis secondary to oral colonization in a hemopoietic stem cell transplant recipient». *Medical Mycology* **45**:187-190. 10.1080/13693780601164306.

[21] CHONG PP, KENNEDY CC, HATHCOCK MA, KREMERS WK, RAZONABLE RR. 2015.«Epidemiology of invasive fungal infections in lung transplant recipients on long-term azole antifungal prophylaxis». *Clinical transplantation* **29**:311-318. 10.1111/ctr.12516.

[22] LARKIN E, HAGER C, CHANDRA J, MUKHERJEE PK, RETUERTO M, SALEM I, LONG L, ISHAM N, KOVANDA L, BORROTO-ESODA K, WRING S, ANGULO D, GHANNOUM M. 2017.«The Emerging Pathogen *Candida auris*: Growth Phenotype, Virulence Factors, Activity of Antifungals, and Effect of SCY-078, a Novel Glucan Synthesis Inhibitor, on Growth Morphology and Biofilm Formation». *Antimicrob Agents Chemother* **61**:. 10.1128/AAC.02396-16.

[23] SPAMPINATO C, LEONARDI D. 2013.«*Candida* Infections, Causes, Targets, and Resistance Mechanisms: Traditional and Alternative Antifungal Agents». *BioMed Research International* **2013**:204237-13. 10.1155/2013/204237.

[24] LIU S, HOU Y, CHEN X, GAO Y, LI H, SUN S. 2014.«Combination of fluconazole with non-antifungal agents: A promising approach to cope with resistant *Candida albicans* infections and insight into new antifungal agent discovery». *International journal of antimicrobial agents* **43**:395-402. 10.1016/j.ijantimicag.2013.12.009.

- [25] CUI J, REN B, TONG Y, DAI H, ZHANG L. 2015.«Synergistic combinations of antifungals and anti-virulence agents to fight against *Candida albicans*». *Virulence* **6**:362-371. 10.1080/21505594.2015.1039885.
- [26] SHRESTHA SK, FOSSO MY, GARNEAU-TSODIKOVA S. 2015.«A combination approach to treating fungal infections». *Scientific Reports* **5**:17070. 10.1038/srep17070.
- [27] MARCOS-ARIAS C, ERASO E, MADARIAGA L, QUINDÓS G. 2011.«*In vitro* activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers». *BMC Complementary and Alternative Medicine* **11**:1-7.
- [28] TZORTZAKIS NG, ECONOMAKIS CD. 2007.«Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens». *Innovative Food Science & Emerging Technologies* **8**:253-258.
- [29] TAO N, OUYANG Q, JIA L. 2014.«Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism». *Food Control* . 10.1016/j.foodcont.2014.01.010.
- [30] DE-LA-FUENTE I, GURIDI A, JAUREGIZAR N, ERASO E, QUINDÓS G, SEVILLANO E. 2023.«*In Vitro* and *In Vivo* Activity of Citral in Combination with Amphotericin B, Anidulafungin and Fluconazole against *Candida auris* Isolates». *Journal of fungi (Basel)* **9**:648. 10.3390/jof9060648.
- [31] BRUNI N, DELLA PEPA C, OLIARO-BOSSO S, PESSIONE E, GASTALDI D, DOSIO F. 2018.«Cannabinoid delivery systems for pain and inflammation treatment». *Molecules* **23**:2478. 10.3390/molecules23102478.
- [32] SCHOF S L, SPARO MD, SANCHEZ BRUNI SF. 2021.«The antimicrobial effect behind *Cannabis sativa*». *Pharmacology Research & Perspectives* **9**:e00761.
- [33] KOSGODAGE US, MATEWELE P, AWAMARIA B, KRAEV I, WARDE P, MASTROIANNI G, NUNN AV, GUY GW, BELL JD, INAL JM, LANGE S. 2019.«Cannabidiol Is a Novel Modulator of Bacterial Membrane Vesicles». *Frontiers in cellular and infection microbiology* **9**:324. 10.3389/fcimb.2019.00324.
- [34] IANIRO G, ROSA L, BONACCORSI DI PATTI, MARIA CARMELA, VALENTI P, MUSCI G, CUTONE A. 2023.«Lactoferrin: From the structure to the functional orchestration of iron homeostasis». *Biometals* **36**:391-416.
- [35] KOWALCZYK P, KACZYŃSKA K, KLECZKOWSKA P, BUKOWSKA-OŚKO I, KRAMKOWSKI K, SULEJCZAK D. 2022.«The lactoferrin phenomenon—a miracle molecule». *Molecules* **27**:2941.
- [36] FERNANDES KE, CARTER DA. 2017.«The antifungal activity of lactoferrin and its derived peptides: mechanisms of action and synergy with drugs against fungal pathogens». *Frontiers in microbiology* **8**:2.
- [37] PAWAR S, MARKOWITZ K, VELLIYAGOUNDER K. 2022.«Effect of human lactoferrin on *Candida albicans* infection and host response interactions in experimental oral candidiasis in mice». *Archives of oral biology* **137**:105399. 10.1016/j.archoralbio.2022.105399.

- [38] BALLARD E, YUCEL R, MELCHERS WJG, BROWN AJP, VERWEIJ PE, WARRIS A. 2020.«Antifungal Activity of Antimicrobial Peptides and Proteins against *Aspergillus fumigatus*». *Journal of fungi (Basel)* **6**:65. 10.3390/jof6020065.
- [39] ARENDRUP MC, MELETIADIS J, MOUTON JW, LAGROU K, HAMAL P, GUINEA J. 2020.«Eucast Definitive Document e. def 7.3. 2».
- [40] ODDS FC. 2003.«Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them». *J Antimicrob Chemother* **52**:1.
- [41] TE DORSTHORST, D. T A, VERWEIJ PE, MELETIADIS J, BERGERVOET M, PUNT NC, MEIS, J. F G M, MOUTON JW. 2002.«*In vitro* interaction of flucytosine combined with amphotericin B or fluconazole against thirty-five yeast isolates determined by both the fractional inhibitory concentration index and the response surface approach». *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**:2982-2989. 10.1128/AAC.46.9.2982-2989.2002.
- [42] WANG L, JIANG N, WANG D, WANG M. 2019.«Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*». *Toxins* **11**:553.
- [43] HUA H, XING F, SELVARAJ JN, WANG Y, ZHAO Y, ZHOU L, LIU X, LIU Y. 2014.«Inhibitory Effect of Essential Oils on *Aspergillus ochraceus* Growth and Ochratoxin A Production». *PLoS ONE* **9**:e108285. 10.1371/journal.pone.0108285.
- [44] WANG Y, FENG K, YANG H, ZHANG Z, YUAN Y, YUE T. 2018.«Effect of Cinnamaldehyde and Citral Combination on Transcriptional Profile, Growth, Oxidative Damage and Patulin Biosynthesis of *Penicillium expansum*». *Frontiers in Microbiology* **9**:597. 10.3389/fmicb.2018.00597.
- [45] SOMOLINOS M, GARCÍA D, CONDÓN S, MACKAY B, PAGÁN R. 2010.«Inactivation of *Escherichia coli* by citral». *Journal of applied microbiology* **108**:1928-1939. 10.1111/j.1365-2672.2009.04597.x.
- [46] OLIVEIRA HBM, SELIS NDN, SAMPAIO BA, JÚNIOR MNS, DE CARVALHO SP, DE ALMEIDA JB, ALMEIDA PP, DA SILVA, ICARO BONYEK SANTOS, OLIVEIRA CNT, BRITO TLS, DA SILVA, LETÍCIA DE OLIVEIRA, TEIXEIRA MM, COELHO, HANNA IZADORA LAÍS NOVAES, BARBOSA CD, ANDRADE, YASMIN MONARA FERREIRA DE SOUSA, BITTENCOURT RDS, VIANA JCS, CAMPOS GB, TIMENETSKY J, UETANABARO APT, YATSUDA R, MARQUES LM. 2021.«Citral modulates virulence factors in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*». *Scientific reports* **11**:16482. 10.1038/s41598-021-95971-y.
- [47] MIRANDA-CADENA K, MARCOS-ARIAS C, PEREZ-RODRIGUEZ A, CABELLO-BEITIA I, MATEO E, SEVILLANO E, MADARIAGA L, QUINDÓS G, ERASO E. 2022.«*In vitro* and *in vivo* anti-*Candida* activity of citral in combination with fluconazole». *Journal of oral microbiology* **14**:2045813. 10.1080/20002297.2022.2045813.
- [48] FRAGUAS-SÁNCHEZ AI, TORRES-SUÁREZ AI. 2018.«Medical use of cannabinoids». *Drugs* **78**:1665-1703.
- [49] BLASKOVICH MA, KAVANAGH AM, ELLIOTT AG, ZHANG B, RAMU S, AMADO M, LOWE GJ, HINTON AO, PHAM DMT, ZUEGG J. 2021.«The antimicrobial potential of cannabidiol». *Communications biology* **4**:1-18.

[50] FELDMAN M, SIONOV RV, MECHOULAM R, STEINBERG D. 2021.«Anti-biofilm activity of cannabidiol against *Candida albicans*». *Microorganisms* **9**:441.

[51] LAHOZ E, PISACANE A, IANNACCONE M, PALUMBO D, CAPPARELLI R. 2008.«Fungistatic activity of iron-free bovin lactoferrin against several fungal plant pathogens and antagonists». *Natural product research* **22**:955-961. 10.1080/14786410701650253.

[52] WAKABAYASHI H, ABE S, OKUTOMI T, TANSHO S, KAWASE K, YAMAGUCHI H. 1996.«Cooperative Anti-*Candida* Effects of Lactoferrin or Its Peptides in Combination with Azole Antifungal Agents». *MICROBIOLOGY and IMMUNOLOGY* **40**:821-825. 10.1111/j.1348-0421.1996.tb01147.x.

[53] KOBAYASHI T, KAKEYA H, MIYAZAKI T, IZUMIKAWA K, YANAGIHARA K, OHNO H, YAMAMOTO Y, TASHIRO T, KOHNO S. 2011.«Synergistic antifungal effect of lactoferrin with azole antifungals against *Candida albicans* and a proposal for a new treatment method for invasive candidiasis». *Jpn J Infect Dis* **64**:292-296.