



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

ANA PAULA RIOS SANTANA DE OLIVEIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia
alnifolia* E *Lippia origanoides* EM FUNGOS DO GÊNERO *Candida* ISOLADOS
DE LESÕES BUCAIS DE PESSOAS VIVENDO COM HIV**

Feira de Santana - BA

Março, 2024

ANA PAULA RIOS SANTANA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alnifolia* E *Lippia organoides* EM FUNGOS DO GÊNERO *Candida* ISOLADOS DE LESÕES BUCAIS DE PESSOAS VIVENDO COM HIV

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Dr^a. Soraya Castro Trindade

Coorientador: Dr. Antonio Pedro Fróes de Farias

Feira de Santana - BA

Março, 2024

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Oliveira, Ana Paula Rios Santana de

O45a Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais da *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* em fungos do gênero *Candida* isolados de lesões bucais de pessoas vivendo com HIV / Ana Paula Rios Santana de Oliveira. - 2024.
47f. : il.

Orientador: Soraya Castro Trindade

Coorientador: Antonio Pedro Fróes de Farias

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 20204

1. *Candida albicans*. 2. *Candida glabrata*. 3. Atividade antifúngica. 4. *Lippia alnifolia*. 5. *Lippia origanoides*. I. Trindade, Soraya Castro, orient. II. Farias, Antonio Pedro Fróes de, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.949.1:616.314

ANA PAULA RIOS SANTANA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia alnifolia* E *Lippia origanoides* EM FUNGOS DO GÊNERO *Candida* ISOLADOS DE LESÕES BUCAIS DE INDIVÍDUOS COM HIV.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de mestre.

Feira de Santana, Bahia, 19 de março de 2024



Orientadora: Profª. Dra. **Soraya Castro Trindade**

Universidade Estadual de Feira de Santana



Membro: Profª. Dra. **Viviane Sarmento Almeida**

Universidade Estadual de Feira de Santana



Documento assinado digitalmente
MARIA DA CONCEIÇÃO AQUINO DE SA
Data: 21/03/2024 05:55:26-0300
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Membro: Profª. Drª. **Maria da Conceição Aquino Sá**

Faculdade Estácio - IDOMED

Para os meus pais.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me permitir viver todos esses anos e realizar este sonho. Jesus é o motivo para sempre continuar.

Aos meu pais Gecilandio e Regiane, sem vocês, nada disso seria possível. Vocês são meus estímulos para não desistir. Obrigada por tudo!

A minha amiga Monique, por me mostrar que o ensino fazia parte da minha vida e que este era o caminho profissional que eu deveria trilhar.

Ao NUPPIIM, por fazer parte dessa fase na minha vida, meus sinceros agradecimentos.

A minha orientadora profa. Soraya Castro Trindade, obrigada por acreditar e me proporcionar esta oportunidade. É minha inspiração profissional. Agradeço a Deus pelo seu doce coração, paciência e sabedoria! Obrigada por tanto.

Ao meu coorientador prof. Antonio Pedro Fróes de Farias, obrigada por passar a experiência vivenciada de forma prática, suas correções me ajudaram a crescer.

A Rebeca e Yuri, por todo apoio e cuidado. A disposição de vocês em me ajudar no laboratório foi essencial.

A Fernanda, com você eu aprendi a não desistir e acreditar que chegaria até aqui. Você se fez presente em todo tempo, obrigada pela amizade e parceria.

Ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana e a todos os professores do Programa de Mestrado em Biotecnologia - UEFS.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente nesta pesquisa, gratidão!

“Quem obedece às suas ordens não será castigado. Quem é sábio encontrará o tempo e o modo apropriado de fazer o que é certo, pois há um tempo e um modo para tudo, mesmo em meio às dificuldades.”

Eclesiastes 8:5,6

RESUMO

A candidíase é uma doença oportunista causada por fungos do gênero *Candida* e possui uma alta prevalência em pessoas vivendo com HIV. Diferentes espécies de plantas do gênero *Lippia* têm despertado o interesse científico pela sua atividade biológica, com propriedades imunomoduladoras e antimicrobianas e seu potencial uso como alternativa terapêutica no controle e tratamento da candidíase. Este trabalho teve como objetivo avaliar a citotoxicidade e ação antimicrobiana dos óleos essenciais de *Lippia alnifolia* e *Lippia organoides* em fungos do gênero *Candida* isolados de lesões de pessoas vivendo com HIV. Para obtenção dos óleos essenciais as plantas foram diluídas em metanol/DMSO (1:3) a 3% e filtradas com membrana estéril de 0,22 µm para obtenção das alíquotas para os testes. Foi realizado a triagem fitoquímica dos óleos essenciais, avaliação de citotoxicidade e atividade antifúngica pelo método de concentração inibitória mínima (MIC). Participaram deste estudo 16 pacientes com diagnóstico positivo para HIV. O diagnóstico da candidíase envolveu a análise clínica das lesões e as amostras foram coletadas utilizando-se swab estéril, transferidas para tubos contendo meio Sabouraud Dextrose e transportadas para o Laboratório de Biologia Oral (LABOR), onde foram realizados os experimentos. Foram isolados nove fungos do gênero *Candida* que foram identificados através de testes bioquímicos como *Candida albicans* (6) e *Candida glabrata* (3). Os óleos da *Lippia alnifolia* e *Lippia organoides* não foram tóxicos em todas as concentrações testadas, pois permitiram uma viabilidade celular maior ou igual a 90%. O óleo essencial da *Lippia alnifolia* apresentou atividade antifúngica com MIC variando entre 0,125 e 10%, já a *Lippia organoides* teve MIC entre 0,25 e 0,5%. Os óleos essenciais de *Lippia alnifolia* e *Lippia organoides* são efetivos no controle *in vitro* de cepas selvagens de fungos do gênero *Candida*, sendo promissores para o tratamento de candidíase.

Palavras-Chave: *Lippia alnifolia*; *Lippia organoides*; candidíase; ação antifúngica.

ABSTRACT

Candidiasis is an opportunistic disease caused by fungi of the genus *Candida*, resulting from a dysbiosis of the oral or intestinal microbiome. This disease is highly prevalent in people living with HIV and serves as a marker of progression to AIDS in individuals not undergoing antiretroviral treatment. Different plant species of the genus *Lippia* have raised scientific interest due to their biological activity with immunomodulatory and antimicrobial properties and their potential use as a therapeutic alternative for controlling and treating candidiasis. Therefore, this study aimed to assess the antifungal action of essential oils of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer and *L. organoides* Kunth, which are rich in carvone and carvacrol, respectively, on *Candida* fungi isolated from lesions of people living with HIV. The essential oils were extracted from plant species of *Lippia alnifolia* and *Lippia organoides* from the municipalities of Rio de Contas and Feira de Santana, respectively, in the State of Bahia. Nine fungi of the genus *Candida* were isolated, identified through biochemical tests. Phytochemical screening of essential oils and evaluation of antifungal activity were carried out using the minimum inhibitory concentration (MIC) method. Oils from *Lippia alnifolia* and *Lippia organoides* were not toxic to PBMC at all concentrations tested, as they allowed cell viability greater than or equal to 90%. The essential oils of *Lippia alnifolia* and *organoides* showed antifungal activity with MIC varying between 0.125 and 10% and 0.25 and 0.5% respectively, and could be a promising alternative in the treatment of infectious diseases of fungal origin.

Keywords: *Lippia alnifolia*; *Lippia organoides*; candidiasis; antifungal action.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie considerada rara e endêmica do Estado da Bahia, EOO inferior a 20.000 km ²	17
Figura 2. Dados do teste de citotoxicidade do óleo da <i>Lippia alnifolia</i>	25
Figura 3. Dados do teste de citotoxicidade do óleo da <i>Lippia origanoides</i>	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação de isolados fúngicos por assimilação de carbono e fermentação de carboidratos. 24

Tabela 2. Concentração inibitória mínima dos óleos essenciais das espécies *Lippia alnifolia* e *Lippia organoides* contra diferentes linhagens de *Candida glabrata* e *Candida albicans*. 26

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1. HIV e AIDS.....	13
2.2. Candidíase/Candidose	13
2.2.1. Candidíase oral	14
2.2.1.1. <i>Candida albicans</i>	14
2.2.1.2. <i>Candida glabrata</i>	15
2.2.1.3. Tratamento da candidíase oral	16
2.3. <i>Lippia alnifolia</i> e <i>Lippia origanoides</i>.....	17
3. OBJETIVOS.....	19
3.1. Geral	19
3.2. Específicos	19
4. MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1. Obtenção e caracterização dos óleos essenciais	20
4.1.1. Preparação dos óleos essenciais para a realização dos testes	20
4.2. Obtenção das amostras fúngicas	20
4.2.1. Seleção dos participantes	20
4.2.2. Diagnóstico de candidíase oral e coleta das amostras.....	20
4.2.3. Isolamento e identificação bioquímica dos fungos	21
4.3. Teste de citotoxicidade dos óleos essenciais	21
4.4. Determinação da atividade antimicrobiana.....	22
4.5. Análise estatística	23
5. RESULTADOS.....	24
5.1. Isolamento e identificação bioquímica dos fungos.....	24
5.2. Ensaio de citotoxicidade	24
5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	26
6. DISCUSSÃO	28

7. CONCLUSÃO	30
REFERÊNCIAS.....	31
APÊNDICE A: Manuscrito submetido à revista <i>Applied Microbiology And Biotechnology Express</i> , ISSN 1432-0614.	36

1. INTRODUÇÃO

A candidíase é uma doença causada por fungos do gênero *Candida* e resulta de uma disbiose do microbioma oral. Esta doença é decorrente de uma infecção oportunista com alta prevalência em pessoas vivendo com HIV. A candidíase oral apresenta-se de diversas formas clínicas, sendo a forma pseudomembranosa a mais frequente em pessoas com imunossupressão, embora também acometa pessoas com o sistema imunitário hígido (Arya; Naureen, 2019; Baumgardner, 2019).

Entre as espécies do gênero *Candida*, *Candida albicans* representa 60% de todas as infecções na mucosa oral que causam candidíase, porém as infecções por *Candida glabrata* também apresenta relevância clínica (Abdehgah *et al.*, 2017). O tratamento das lesões causadas por estes fungos é dificultado pela resistência aos medicamentos antifúngicos convencionais (Arendrup; Patterson, 2017).

Com o aumento da resistência fúngica aos tratamentos convencionais, o uso de produtos naturais tem se tornado uma alternativa importante para o tratamento dessas infecções, por apresentarem compostos e moléculas bioativas com atividade antifúngica e imunomoduladora (Trindade *et al.*, 2021). O interesse científico e comercial de substâncias naturais cresceu nos últimos anos no Brasil, pesquisadores estão buscando compreender as suas propriedades biológicas, como efeitos analgésicos, anti-inflamatórios, antibacterianos e antifúngicos (Oliveira *et al.*, 2018; Warad *et al.* 2014).

As plantas do gênero *Lippia* possuem inúmeras propriedades terapêuticas e são utilizadas na cultura popular para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo afecções da cavidade oral (Oliveira *et al.*, 2018). *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer, também conhecida como pedrécio, alecrim de vaqueiro e alecrim do mato, possui propriedades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antibacteriana, entre outras (Figueiredo *et al.*, 2008). Já *Lippia origanoide* Kunth, também conhecido como alecrim-pimenta, alecrim-do-nordeste e estrepa-cavalo, é um arbusto medicinal que apresenta em sua composição timol, ou uma mistura de timol e carvacrol, agentes com propriedades antimicrobianas (Trindade *et al.*, 2021).

O óleo essencial das diferentes espécies de *Lippia* podem servir de opção para o tratamento de infecções oportunistas, como as causadas por fungos do gênero *Candida*. O desenvolvimento de fitoterápicos capazes de transpor as resistências fúngicas torna-se uma nova opção para o tratamento de fungos resistentes aos

medicamentos convencionais (Barreto *et al.*, 2014; Costa *et al.*, 2017; Trindade *et al.*, 2021).

Algumas propriedades biológicas dos óleos do gênero *Lippia* já foram documentadas (Oliveira *et al.*, 2018), no entanto, existem lacunas na literatura acerca da sua atividade antifúngica, especialmente em cepas selvagens patogênicas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. HIV e AIDS

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) é uma doença retroviral causada pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV). Esta doença é caracterizada pela supressão do sistema imunológico em virtude do declínio dos níveis de Linfócitos T (Souza *et al.*, 2017). O vírus tem afinidade pelas células T hospedeiras via moléculas de CD4+ e receptores de quimiocina. Após a adesão, o RNA do HIV e várias enzimas que codificam novas partículas virais são liberadas na célula hospedeira infectando o indivíduo com o vírus (Robbins *et al.*, 2010).

Após ser exposto, a pessoa pode passar meses ou anos de forma assintomática e à medida que o vírus acomete o sistema imunológico, começam a aparecer os primeiros sinais e sintomas da doença, resultando em uma maior suscetibilidade a infecções oportunistas, especialmente aquelas que afetam a cavidade oral, cabeça e pescoço (Cotran *et al.*, 2000). As manifestações orais, incluindo candidíase, são comuns em pessoas assintomáticas e muitas vezes pode se apresentar como primeiros sinais de progressão da infecção (Nicolielo *et al.*, 2013; Souza *et al.*, 2017).

2.2. Candidíase/Candidose

A candidíase é uma doença fúngica causada por fungos do gênero *Candida*, sendo a espécie mais prevalente a *Candida albicans* (Hellstein; Marek, 2019). No entanto, aumentos recentes na incidência clínica de outras espécies não *albicans* foram observadas, particularmente para espécies resistentes aos antifúngicos (Ricotta *et al.*, 2020).

A candidíase é comum em pessoas vivendo com HIV e imunossuprimidos devido ao consumo de corticosteroides ou drogas citotóxicas, que comprometem a sua imunidade. O uso de antibióticos, diabetes mellitus, gravidez, controle hormonal da natalidade, radioterapia, quimioterapia ou o uso de drogas imunossupressoras aumentam as chances de desenvolver essa doença (Arya; Naureen, 2020). O aumento da frequência de infecções por patógenos fúngicos resistentes a drogas e

multidrogas apresenta um desafio clínico moderno complexo que requer atenção urgente (Ribeiro *et al.*, 2021).

A candidíase orofaríngea é a infecção fúngica oportunista mais comum nas pessoas vivendo com HIV. Estima-se que ocorra em 80 a 90% das pessoas com essa infecção em alguma fase de sua doença e é considerada como um marcador independente de imunodeficiência (Spalanzani *et al.*, 2018).

2.2.1. Candidíase oral

A candidíase oral compromete o paladar e a deglutição, levando a uma diminuição do apetite (Lyu *et al.*, 2016). É uma doença introdutória para complicações da candidíase do tipo orofaríngeas, esofágicas, laríngeas e sistêmicas (Perazzo *et al.*, 2004; Urizar, 2002). Ela apresenta variadas manifestações clínicas, sendo as mais frequentes divididas em três principais tipos clínicos:

a) pseudomembranosa - afeta principalmente as pessoas com imunodeficiência, sendo caracterizada pelo aparecimento de placas moles, multifocais ou difusas, ligeiramente elevadas, localizadas na mucosa jugal, língua, palato e região retromolar (Simões *et al.*, 2013);

b) eritematosa - pode surgir como sequela da anterior ou instalar-se, após tratamento com antibióticos de largo espectro, corticoides ou imunodepressores. A mucosa fica com aspecto seco e brilhante, podendo ser observadas pequenas placas e úlceras superficiais muito dolorosas;

c) já a hiperplásica diferencia-se por apresentar placas ou nódulos de cor esbranquiçada que não são removíveis por raspagem. Esses são firmes devido a uma infiltração profunda das hifas nos tecidos, e persistentes, podendo durar vários anos, lembrando as placas leucoplásicas, e, por isso, se admite a suscetibilidade de possuírem neoplasia malignas (Perazzo *et al.*, 2004; Simões *et al.*, 2013).

Entre as espécies relacionadas às lesões intraorais estão a *C. albicans* e *C. glabrata* com maior índice de repetição (Guinea, 2014).

2.2.1.1. *Candida albicans*

A *Candida albicans* faz parte da microbiota natural do ser humano, tendo o seu primeiro contato logo no nascimento do indivíduo, neste caso, o fungo coloniza a cavidade oral do recém-nascido, sem causar nenhum dano (Mayer *et al.*, 2013).

Quando se fala em patogenicidade, essa espécie se torna nociva no momento em que se instala em uma região do corpo que não é seu habitat natural, tornando-se um patógeno oportunista capaz de causar desordens que vão desde micoses superficiais até infecções sistêmicas potencialmente fatais. Estudos mostram que este fungo causa a evasão da resposta imune do hospedeiro e adquire nutrientes para as demandas bioenergéticas do crescimento infeccioso (Silao *et al.*, 2023).

Na ocasião em que ocorre uma ruptura do equilíbrio biológico, pode haver um aumento na multiplicação e invasão dos tecidos por este patógeno (Suzuki, 2009; Valle *et al.*, 2010). A levedura inicia o seu crescimento na fase log como células em brotamento (blastoconidia) com forma esférica ou oval. Além disso, podem produzir um tipo de crescimento filamentoso, como hifas verdadeiras ou mais frequentemente, pseudo-hifas (Larone, 2002; Silva *et al.*, 2012).

2.2.1.2. *Candida glabrata*

Infecções invasivas por *Candida* representam uma preocupação crescente em ambientes de saúde, especialmente entre pessoas imunocomprometidas de alto risco, como aqueles que têm câncer. Apesar de *C. albicans* ser a espécie mais frequente, outras espécies de *Candida* aumentaram significativamente nas últimas duas décadas, como por exemplo a *Candida glabrata*, o que preocupa, devido a sua resistência a azóis (Abdel-Hamid *et al.*, 2023).

Experimentos confirmam que a *Candida glabrata*, é um patógeno com considerável número de cepas e suscetibilidade reduzida a drogas antifúngicas azólicas. *C. glabrata* é um dos patógeno mais frequentes em casos de candidíases, principalmente em ambientes hospitalares (Savastano *et al.*, 2016; Trick *et al.*, 2002).

Doi e colaboradores (2016) demonstraram que *C. glabrata* foi responsável por 6,4% do total de infecções causadas por *Candida* em pessoas hospitalizados e comparando-se a mortalidade entre outras espécies de *Candida não-albicans*, a da *C. glabrata* é relativamente alta.

A *C. glabrata* apresenta outros fatores de virulência como: interromper a maturação fagossômica em macrófagos, aderir em superfícies inanimadas e formar biofilme (Rodrigues *et al.*, 2014). Possui colônias lisas e de cor creme, que são praticamente indistinguíveis das de outras espécies de *Candida*, exceto por seu tamanho menor (Calderone, 2002).

2.2.1.3. Tratamento da candidíase oral

O controle da candidíase oral inicia-se através de uma boa higiene bucal e o exame bucal periódico, controlando os fatores predisponentes ou facilitadores, são fundamentais para prevenir infecções e facilitar o tratamento caso ocorram (Quindós *et al.*, 2019). A primeira escolha para o controle da candidíase oral nas pessoas imunocompetentes ou com imunodepressão leve são feitos com antifúngicos tópicos e apresentam resultados eficazes (Siqueira *et al.*, 2015).

No entanto, nos casos de imunodepressão o problema maior está na alta taxa de recorrências ou recidivas, requerendo a combinação de uma terapia intensiva tanto sistêmica como local. Em alguns casos se inclui propor a possibilidade de instaurar um tratamento profilático com derivados azólicos, como nas pessoas com HIV (Peres *et al.*, 2019; Pinto *et al.*, 2013; Urizar, 2002).

Entretanto, o uso de agentes químicos convencionais tem apresentado restrições importantes, a exemplo do aumento da resistência antifúngica, que determina um maior controle no uso de antifúngicos, dos efeitos colaterais adversos desses medicamentos, que restringem o seu uso a um curto período e dos devastadores impactos ambientais impostos pela sua utilização (Oliveira *et al.*, 2018).

Dentre os antifúngicos mais utilizados, destacam-se a classe dos azóis, que inclui os imidazóis (butoconazol, clotrimazol, miconazol e cetoconazol) e triazóis (fluconazol e terconazol), que atuam inibindo a ação da síntese do ergosterol e a classe dos polienos (anfotericina B e nistatina), que alteram a permeabilidade da membrana celular fúngica (Costa *et al.*, 2003). Os azóis tem uma taxa média de cura clínica em torno 85-90%, quando comparado com a nistatina, onde a cura se estabelece em 75-80% dos casos não complicados (Gonçalves *et al.*, 2016).

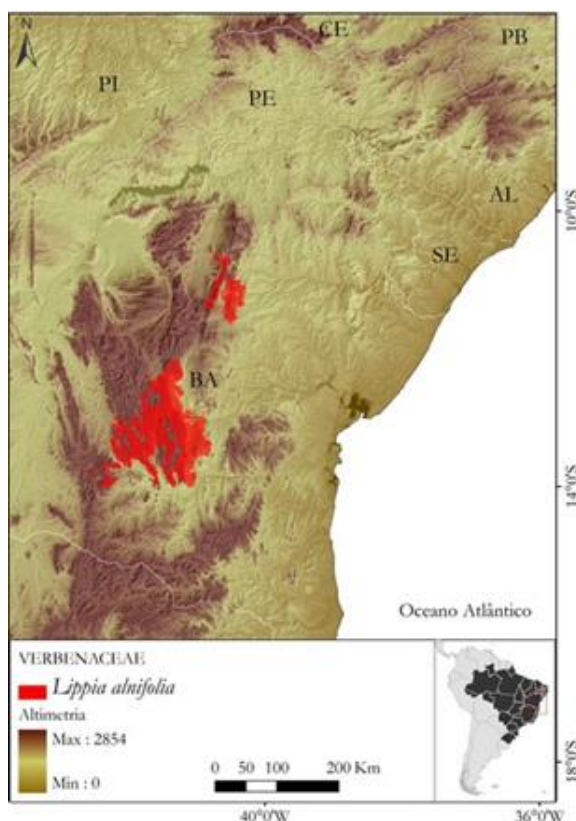
Para se obter um bom resultado no tratamento, é necessário ter um diagnóstico precoce e preciso do tipo de candidíase oral, correção dos fatores predisponentes ou doenças de base e uso dos antifúngicos adequados. A prática de uma boa higiene bucal e o exame bucal periódico, controlando os fatores predisponentes ou facilitadores, são fundamentais para prevenir infecções e facilitar o tratamento caso ocorram (Quindós *et al.*, 2012).

2.3. *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides*

O uso de óleos essenciais (OE) é uma prática comum na medicina popular (Oliveira *et al.*; 2018; Warad *et al.*, 2014). As plantas do gênero *Lippia*, encontradas em diversos estados do Brasil, possuem inúmeras propriedades terapêuticas e são utilizadas para o tratamento de diversas enfermidades, incluindo afecções da cavidade bucal (Oliveira *et al.*, 2018).

A *Lippia alnifolia* é uma planta considerada rara e endêmica do Estado da Bahia, principalmente na região da Chapada Diamantina (Figura 1) (Salimena *et al.* 2011). Trata-se de um arbusto de até 2,5 m de altura, possui folhas coriáceas, aromáticas, rugosas e flores rosadas. É encontrada em afloramentos rochosos de campos rupestres. Floresce em março e julho e frutifica em julho (CNCflora, 2019).

Figura 1. Espécie considerada rara e endêmica do Estado da Bahia, EOO inferior a 20.000 km².



Fonte: CNCflora *Lippia alnifolia*.

O óleo da *Lippia alnifolia* tem como principal composto o monoterpeno, porém outras moléculas também fazem parte da sua composição, como carvona, β -cariofileno, carvacrol, limoneno e óxido de piperitenona (Vilela *et al.*, 2019).

Dentre as funções biológicas que os óleos essenciais desempenham, já foram relatadas atividades antioxidante, anti-inflamatória, analgésica, anticancerígena, antifúngica, antibacteriana, larvicida, fungicida, entre outras. Também são descritos efeitos antidepressivos, ansiolíticos, sedativos, anticonvulsivos, hipnóticos, relaxantes musculares e anestésicos (Figueiredo *et al.*, 2008).

Esta planta expressa efeitos benéficos quando utilizada como antisséptico tópico contra dermatite e caspa, antisséptico oral e em infecções vaginais, tendo demonstrado atividade antisséptica e antimicrobiana contra diversos agentes infecciosos. Apesar das suas funções biológicas, ainda existe uma escassez da literatura que comprove esta atividade. Portanto, são necessários estudos de bioprospecção para investigar a atividade antimicrobiana e bioquímica de extratos da *Lippia alnifolia* (Pinto *et al.*, 2013), bem como e o seu potencial comercial.

Já *Lippia origanoides* também conhecido como alecrim-pimenta, alecrim-do-nordeste e estrepá-cavalo, é um arbusto medicinal que apresenta em sua composição timol, ou uma mistura de timol e carvacrol, agentes com propriedade antimicrobiana, além de outros componentes químicos como flavonoides e quinonas (Trindade *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- ✓ Avaliar a ação antifúngica dos óleos essenciais das folhas de *Lippia alnifolia* e *Lippia organoides* em *Candida albicans* e *Candida glabrata* de lesões de pessoas vivendo com HIV.

3.2. Específicos

- ✓ Obter os óleos essenciais das folhas da *Lippia alnifolia* e *Lippia organoides*;
- ✓ Isolar e identificar fungos do gênero *Candida* de lesões de pessoas com diagnóstico de pessoas vivendo com HIV;
- ✓ Analisar a citotoxicidade dos óleos essenciais frente as células mononucleadas do sangue periférico;
- ✓ Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais das folhas da *Lippia alnifolia* e *Lippia organoides* frente aos fungos isolados.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção e caracterização dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram extraídos de espécies vegetais de *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* oriundas dos municípios de Rio de Contas e Feira de Santana, respectivamente, no Estado da Bahia. A coleta, extração e identificação química destes óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Produtos Naturais (LAPRON), da UEFS, e as informações foram descritas em estudos publicados previamente (Vilela *et al.*, 2019; Menezes *et al.*, 2018).

4.1.1. Preparação dos óleos essenciais para a realização dos testes

Os óleos essenciais das espécies do gênero *Lippia* foram diluídos em metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil) / DMSO (Dimetilsulfóxido) (Synth) (1:3) a 3% e filtrados com membrana estéril de 0,22 µm para obtenção das alíquotas para os testes.

4.2. Obtenção das amostras fúngicas

4.2.1. Seleção dos participantes

Participaram deste estudo 16 pacientes maiores de 18 anos, com diagnóstico positivo para HIV, no Hospital Universitário Professor Edgard Santos (HUPES), Bahia, Brasil. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (HUPES-Universidade Federal da Bahia, aprovação nº 1.035.826) e todos os participantes assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Não foram incluídos nesse processo os fumantes e os pacientes que apresentaram alguma incapacidade temporária ou permanente para responder à anamnese.

4.2.2. Diagnóstico de candidíase oral e coleta das amostras

As amostras foram coletadas das lesões detectadas na mucosa oral utilizando-se swab estéril, transferidas para tubos contendo meio Sabouraud Dextrose (Kasvi, Itália) e transportadas sob refrigeração para o Laboratório de Biologia Oral (LABOR)

na Universidade Estadual de Feira de Santana, onde foram realizados os experimentos (Muzyka; Epifanio, 2013).

O diagnóstico da candidíase envolveu a análise clínica das lesões associada à citologia esfoliativa, seguido da cultura para identificação do microrganismo da amostra coletada (Hellstein; Marek, 2019).

4.2.3. Isolamento e identificação bioquímica dos fungos

As amostras foram plaqueadas pela técnica de esgotamento por estrias em meio seletivo para fungos do gênero *Candida*. Os isolados fúngicos foram ativados em meio ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, Itália) a 37°C por 48 horas. Após o crescimento, os fungos foram identificados por provas de urease, sacarose, maltose, lactose, trealose, xilose, nitrato e glicose.

4.3. Teste de citotoxicidade dos óleos essenciais

Para a realização do teste de citotoxicidade dos óleos essenciais, células mononucleares do sangue periférico (CMSP) foram obtidas através da coleta e processamento do sangue de um voluntário. As CMSP foram distribuídas em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI com 1% de antibiótico/antimicótico e 10% de soro fetal bovino e os óleos essenciais de *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* foram adicionados em diferentes concentrações: 1%; 0,5%; 0,25% e 0,125%. Para controle negativo foi adicionado um poço contendo apenas as células em meio de cultura. O controle positivo para a presença de citotoxicidade foi o dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma-Aldrich Co., SP, Brasil) a 50% e as células.

Depois de 48 horas de incubação a 37°C em câmara úmida com atmosfera de 5% de CO₂, a placa foi centrifugada a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi aspirado e, em seguida, 100µl da solução de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-brometo de difeniltetrazólio (MTT, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) a 6 mg/mL foram adicionados ao poço.

As células foram novamente incubadas por 4 horas em câmara úmida a 37°C e 5% de CO₂, e o conteúdo dos poços foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos a 4°C. Após a retirada do meio de cultura, 100 µL DMSO foram adicionados a cada poço. A leitura do valor de absorbância foi determinada no comprimento de onda de

625 nm utilizando um leitor de microplacas. Compostos que permitiram viabilidade celular maior ou igual a 90% foram considerados não tóxicos (Silveira *et al.*, 2010).

4.4. Determinação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi determinada pelo antibiograma, usando a técnica de concentração inibitória mínima (MIC) pelo método de microdiluição em caldo proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*, Norma M100-S15 (CLSI, 2022).

Além dos fungos isolados de lesões, foram utilizadas duas cepas comerciais do catálogo de cultura da Fundação André Tosello: *Candida albicans* ATCC 10321 e a *Candida glabrata* ATCC 15261.

As diferentes linhagens de *Candida* foram ativadas em caldo Sabouraud e mantidas em incubação a 37°C por 48h. Depois foi realizado o repique em meio Ágar Sabouraud Dextrose (Kasvi, Itália) e nova incubação a 37°C, por 48h. Em seguida, as colônias foram transferidas para tubos contendo 4,5 mL de solução salina (0,85%), que, após homogeneizado, foi comparado ao tubo padrão 0,5 da escala McFarland ($\sim 1 \times 10^3$ UFC/mL) para padronização. A confirmação foi feita por leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 625 nm (Polaris, Celer, Brasil) de acordo com a Norma M27-A2-Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras; à Terapia Antifúngica Norma Aprovada-Segunda Edição do NCCLS (2002).

Para a realização do ensaio, foram distribuídos 90 µL / poço do meio de cultura caldo Sabouraud Dextrose (Kasvi, Itália) em placa de 96 poços estéril e 100 µL / poço do óleo essencial das diferentes espécies de *Lippia*, em diferentes concentrações (10% - 0,125%), obtidas através de sucessivas diluições seriadas (1:1), em triplicata. Como controles, foram utilizados DMSO a 3% e Ciclopiroxolamina 5mg/mL. Foram distribuídos 10 µL de suspensão das diferentes amostras de *Candida glabrata* e *Candida albicans* ($\sim 1 \times 10^3$ UFC/mL) em cada poço, exceto no controle branco (contendo apenas 200 µL / poço do caldo). Após as inoculações, a placa foi incubada em estufa bacteriológica a 37°C, por 48 horas.

Para a confirmação da atividade antifúngica, todos os poços que não mostraram crescimento do fungo após o período de incubação, foram subcultivados. Uma alíquota de 1 µL da amostra foi retirada, semeada na placa Petri com Ágar

Sabouraud Dextrose e incubada a 37 °C por 48h, em triplicata. Após este período, a concentração fungicida mínima foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte do fungo, não permitindo o crescimento visível de qualquer colônia fúngica.

4.5. Análise estatística

Para a análise de citotoxicidade, o percentual de morte celular foi calculado e comparado com os controles. Aquelas concentrações que apresentaram até 90% de viabilidade celular (em comparação com o controle negativo), foram consideradas não tóxicas. Em seguida, a normalidade dos dados foi testada com o teste Kolmogorov-Smirnov e então foi empregado o teste ANOVA seguido do pós-hoc Dunnett. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. Para avaliação da atividade antifúngica foi feita uma análise descritiva dos resultados.

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e identificação bioquímica dos fungos

A identificação bioquímica dos isolados fúngicos é mostrada na Tabela 1. A partir dos testes realizados após a semeadura dos fungos, os halos de crescimento resultante da fermentação de carboidratos, da assimilação nas fontes de carbono, associada à observação das características morfológicas, indicaram um total de nove isolados fúngicos, dos quais seis eram da espécie *Candida albicans* e os outros três da espécie *Candida glabrata*.

Tabela 1. Identificação de isolados fúngicos por assimilação de carbono e fermentação de carboidratos.

Isolado	Fermentação		Fontes de assimilação de carbono									Microrganismo
	Gli	Lac	Xil	Ure	Ter	Raf	Mal	Ino	Gli	Lac	Sac	
1 Ca	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>C. albicans</i>
2 Ca	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>C. albicans</i>
3 Ca	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>C. albicans</i>
4 Ca	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>C. albicans</i>
5 Ca	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	+	<i>C. albicans</i>
6 Ca	+	-	+	-	+	+	+	-	+	-	+	<i>C. albicans</i>
1 Cg	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	<i>C. glabrata</i>
2 Cg	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	<i>C. glabrata</i>
3 Cg	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	+	<i>C. glabrata</i>

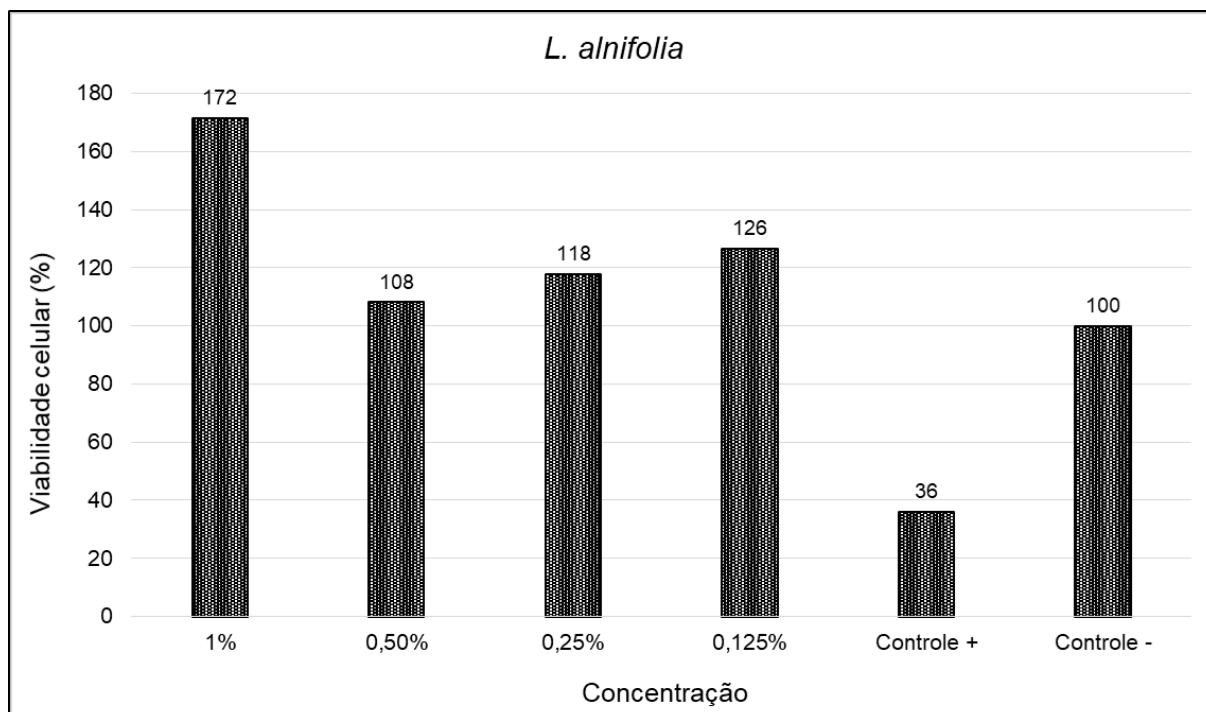
Xil - xilose; Ure - ureia; Tre - trealose; Raf - rafinose; Mal - maltose; Ino - inositol; Gli - glicose; Lac - lactose; Sac - sacarose. + Positivo; - Negativo.

Embora tenham sido identificadas seis cepas da espécie *C. albicans*, as cepas 1 e 6 apresentam diferenças das demais e entre si quanto às fontes de assimilação de carbono. As três cepas de *C. glabrata* identificadas apresentam diferenças nas fontes de assimilação de carbono. Quanto ao padrão de fermentação, todas as cepas de ambas as espécies apresentaram comportamento semelhante.

5.2. Ensaio de citotoxicidade

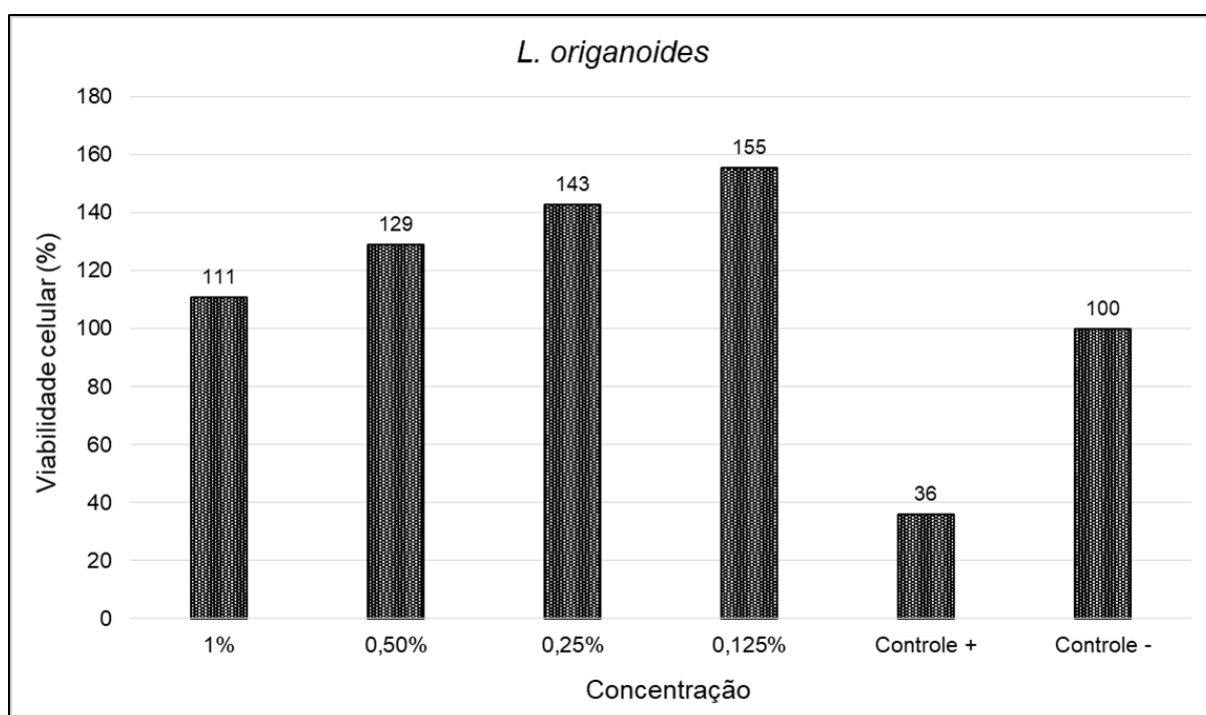
Os resultados do teste de citotoxicidade dos óleos das plantas de *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* são apresentados nas Figuras 1 e 2, respectivamente.

Figura 2. Dados do teste de citotoxicidade do óleo da *Lippia alnifolia*.



Fonte: o autor. Controle + (meio de cultura + DMSO 50%), Controle - (meio de cultura + DMSO 3%).

Figura 3. Dados do teste de citotoxicidade do óleo da *Lippia origanoides*.



Fonte: o autor. Controle + (meio de cultura + DMSO 50%), Controle - (meio de cultura + DMSO 3%).

Os óleos da *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* não foram tóxicos para as CMSP em todas as concentrações testadas, pois permitiram uma viabilidade celular maior ou igual a 90%. A comparação dos valores absolutos da densidade óptica mostrou que todas as concentrações não diferiram estatisticamente do controle negativo (branco). A partir da análise dos dados, pode-se verificar que ambos os óleos apresentaram efeito linfoproliferativo nas concentrações testadas, em comparação com o controle positivo. O efeito da *L. origanoides* apresentou uma relação dose-dependente negativa, isto é, quanto menor a concentração, maior a proporção de células viáveis.

5.3. Avaliação da atividade antimicrobiana

Os resultados do teste de inibição são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (MIC) dos óleos essenciais das espécies *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* contra diferentes linhagens de *Candida glabrata* e *Candida albicans*.

Microrganismo	<i>L. alnifolia</i>		<i>L. origanoides</i>	
	MIC	Efeito	MIC	Efeito
<i>C. glabrata</i> (ATCC 15261)	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. glabrata</i> 1	0.5%	*	0.5%	*
<i>C. glabrata</i> 2	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. glabrata</i> 3	0.125%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> (ATCC 10321)	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 1	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 2	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 3	0.25%	*	0.5%	*
<i>C. albicans</i> 4	1%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 5	0.5%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 6	10%	*	0.25%	*

* Efeito fungicida.

O óleo essencial da *Lippia alnifolia* apresentou atividade antifúngica contra todas as linhagens de *Candida albicans* e *Candida glabrata* testadas, com MIC variando entre 0,125 e 10%. O mesmo foi observado para o óleo essencial da *Lippia*

origanoides, que também inibiu todas as linhagens de *Candida*, selvagens ou comerciais, mas com concentrações variando entre 0,25 e 0,5%.

Os óleos essenciais testados apresentaram atividade fungicida, verificada pelo teste de concentração fungicida mínima. O óleo essencial das folhas de *L. alnifolia* apresentou concentrações inibitórias mínimas para as cepas de *C. glabrata* que variaram de 0,125% (cepa 03) a 0,5% (cepa 01). Para a *C. albicans*, as concentrações inibitórias variaram de 0,5% (cepa 05) a 10% (cepa 06). O óleo essencial das folhas de *L. origanoides* apresentou atividade fungicida em uma MIC de 0,25% para a maioria das cepas de *C. glabrata*, com exceção da cepa 01, para qual a concentração inibitória foi de 0,5%. Na *C. albicans*, a MIC do óleo de *L. origanoides* foi de 0,25% para todas as cepas, exceto para a cepa 03, que foi inibida na concentração de até 0,5%.

6. DISCUSSÃO

Os óleos essenciais de *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* inibiram o crescimento *in vitro* de fungos das espécies *C. glabrata* e *C. albicans*, microrganismos associados à disbiose em pessoas imunocomprometidas. Algumas linhagens dessas espécies fúngicas são resistentes ao tratamento com medicamentos azólicos (Abdehgah *et al.*, 2017; Mushi *et al.*, 2017). Além disso, considerando que os antifúngicos da classe da nistatina e do miconazol (cuja ação é tópica) são menos efetivos, os antifúngicos de ação sistêmica são a melhor opção terapêutica neste grupo de pacientes, mas apresentam limitações, como a toxicidade hepática (Freitas *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2009).

A ação antifúngica de espécies de *Lippia* já foi demonstrada previamente (Oliveira *et al.*, 2018; Santos *et al.*, 2016; Trindade *et al.*, 2021), no entanto os estudos encontrados utilizavam apenas cepas comerciais (Freitas *et al.*, 2018). Assim, este estudo traz um avanço ao corpo de evidências já existente, visto que investigou a ação antifúngica de *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* em cepas selvagens de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, coletadas de lesões de candidíase oral em pessoas vivendo com HIV, diante da sua predisposição à ocorrência de candidíase e de outros agravos bucais (Oukerrou *et al.*, 2017; Kumar *et al.*, 2014; Souza *et al.*, 2017).

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais podem estar associados à presença dos compostos majoritários carvona, na *L. alnifolia* (Vilela *et al.*, 2019) e carvacrol, na *L. origanoides* (Menezes *et al.*, 2018), embora a contribuição dos outros constituintes não possam ser descartada. Grande parte desses mecanismos parecem ser direcionados à membrana celular dos fungos, como a inibição da síntese de ergosterol e de quitina, componentes que regulam a sua permeabilidade e integridade (Cadena *et al.*, 2021; Peixoto *et al.*, 2018). Outra forma de atuação pode ser a oxidação lipídica da membrana, alterando a sua seletividade e interferindo, assim, no metabolismo da célula (Garcia *et al.*, 2008; Peixoto *et al.*, 2018).

Outro achado relevante para a aplicabilidade clínica dos óleos essenciais testados foi a ausência de toxicidade para as células humanas. Esse dado pode ser decorrente das concentrações utilizadas, que apresentaram atividade antifúngica em quase todas as cepas, demonstrando a segurança no uso desses óleos, como já descrito anteriormente (Oliveira *et al.*, 2018; Trindade *et al.*, 2021). Entretanto, ensaios

pré-clínicos *in vivo* devem ser realizados para a sua confirmação em sistemas complexos.

Observou-se que os óleos de *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* estimularam a proliferação de células mononucleares do sangue periférico, *in vitro*, dado ainda não encontrado na literatura até o momento. O comportamento da proliferação *in vitro* de células mononucleares do sangue periférico humanas na presença do óleo essencial de *Lippia alnifolia* foi diferente de *Lippia origanoides*, certamente está correlacionado às diferenças na sua composição, com presença majoritária de carvona na espécie *L. alnifolia* e de carvacrol na espécie *L. origanoides*. Vale evidenciar, ainda, a presença de outros terpenos em ambas as espécies, o que ajudaria a ampliar as diferenças de composição observadas (Menezes *et al.*, 2018; Vilela *et al.*, 2019).

Esse achado traz novas perspectivas no campo da terapia com produtos naturais à base dessas plantas, uma vez que a indução da proliferação de células do sistema imunitário é desejada no controle de infecções virais, células tumorais, dentre outros. No entanto, são necessárias investigações para a identificação do tipo celular que está proliferando e do seu perfil fenotípico quanto à atividade efetora. Além disso é necessário interpretar esses dados com parcimônia, por se tratar de um ensaio *in vitro*.

A atividade fungicida dos óleos pode ser considerada promissora para o tratamento da candidíase oral. Estudos *in vivo* devem ser conduzidos para determinar a concentração e os veículos adequados para a administração dos óleos, como enxaguatórios bucais, membranas ou cremes em orabase.

7. CONCLUSÃO

Os óleos de *Lippia alnifolia* e *Lippia origanoides* são efetivos no controle *in vitro* de cepas selvagens de *Candida albicans* e *Candida glabrata*, sendo o óleo *Lippia origanoides* efetivo em concentrações menores para todas as cepas testadas, se tornando a melhor alternativa para o tratamento. Ambos se mostraram uma alternativa viável no tratamento de candidíase.

REFERÊNCIAS

- ABDEHGAH, I. B.; ALIREZA, K.; SHAMSAZAR, A; NEGAHDARY, M; JAFARZADEH, M; RAHIMI, G. In vitro antifungal effects of biosynthesized silver nanoparticle by *Candida albicans* against *Candida glabrata*. **Biomedical Research-Tokyo**, v. 28, n. 7, p. 2870-2876, 2017.
- ABDEL-HAMID R. M.; EL-MAHALLAWY, H. A.; ABDELFATTAH, N. E. The impact of increasing non-albicans *Candida* trends on diagnostics in immunocompromised patients. **Braz J Microbiol**, 2023.
- ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **J Infect Dis**, v. 216, n. 3, p. 445-451, 2017.
- ARYA, N. R.; NAUREEN, B. R. Candidiasis. **StatPearls Publishing**. 2019.
- BAUMGARDNER, D. J. Oral fungal microbiota: to thrush and beyond. **J Patient Cent Res Rev**, v. 6, p. 252-261, 2019.
- BARRETO, H. M.; LIMA, I. S.; COELHO, K. M. R. N.; OSÓRIO, L. Â. R.; MOURÃO, R. A.; SANTOS, B. H. C.; COUTINHO, H. D. M.; ABREU, A. P. L.; MEDEIROS, M. G. F.; CITÓ, A. M. G. L.; LOPES, J. A. D. Effect of *Lippia origanoides* essential oil in the resistance to aminoglycosides in methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Eur J Integr Med*, v. 6, p. 560-564, 2014.
- CADENA, K. M.; ARIAS, C. M; MATEO, E.; AGUIRRE-URIZAR, J. M.; QUINDÓS, G.; ERASO, E. In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. **Biomed Pharmacother**. 2021.
- CALDERONE, R. A. Introduction and historical perspectives. *Candida* and Candidiasis. **ASM Press**, p. 15–25, 2002.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement. **CLSI document M100-S15**. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2005.
- CNCFlora. ***Lippia alnifolia* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2** Centro Nacional de Conservação da Flora. Disponível em <[http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia alnifolia](http://cncflora.jbrj.gov.br/portal/pt-br/profile/Lippia%20alnifolia)>. Acesso em 26 dezembro 2019.
- COSTA, M.; FERNANDES, O. D. F. L.; SILVA, M. D. R. R. Candidiase vulvovaginal: aspectos clinicos, tratamentos oral com azólicos e suscetibilidade in vitro. **Rev Patol Trop**, v. 32, n. 2, p. 145-162, 2003.
- COSTA, P. S.; SOUZA, E. B.; BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 58-171, 2017.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Doenças da imunidade. In: Robbins SL. Patologia estrutural e funcional. 6. ed. Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**. Cap. 7, p.168-232. 2000.

DOI, A. M.; PIGNATARI, A. C. C.; EDMOND, M. B.; MARRA, A. R.; CAMARGO, L. F. A.; SIQUEIRA, R. A.; MOTA, V. P.; COLOMBO, A. L. Epidemiology and microbiologic characterization of nosocomial candidemia from a Brazilian National Surveillance Program. **PLoS ONE**, v. 11, n. 1, p. 1-9, 2016.

FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; JOHANNES J. C. SCHEFFER. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Frag J**, v. 23, p. 213-226, 2008.

FREITAS, M.; MACHADO, A.; DORIA, A.; HAGE, R.; KHOURI, S. Padronização da metodologia utilizando terapia fotodinâmica sobre cepa de *Candida albicans* isolada de cateter. **Revista Univap**. São José dos Campos-SP-Brasil, v. 24, n. 44, jul. 2018.

GARCIA, R; ALVES, E. S; SANTOS, M. P; AQUIJE, G. M; FERNANDES, A. A; DOS SANTOS, R. B; VENTURA, J. A; FERNANDES, P. M. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. **Braz J Microbiol**. 2008.

GONÇALVES, B.; FERREIRA, C.; ALVES, C. T.; HENRIQUES, M.; AZEREDO, J.; SILVA, S. Vulvovaginal candidiasis: Epidemiology, microbiology and risk factors. **Crit Rev Microbiol**, v. 42, n. 6, p. 905-927, 2016.

GUINEA, J. Global trends in the distribution of *Candida* species causing candidemia. **Clinical Microbiology and Infection**, v.20, n. 6, p. 5–10, 2014.

HELLSTEIN, J. W.; MAREK, C. L. Candidiasis: red and white manifestations in the oral cavity. **Head Neck Pathology**, v. 13, n. 1, p. 25-32, 2019.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins and Cotran pathologic basis of diseases (9th ed.). **Philadelphia: Elsevier Saunders**. 2014.

LARONE, D. Medically Important Fungi; A Guide to Identification. **ASM Press**, 4 ed., Washington, 2002.

LYU, X.; ZHAO, C.; YAN, Z. M. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. **Drug Des Devel Ther**, v. 10, p. 1161-1171, 2016.

MAYER, F. L.; WILSON, D.; HUBE, B. *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. **Virulence**, v. 4, n. 2, p.119-128, 2013.

MENEZES, P. M. N.; BRITO, M. C.; PAIVA, G. O.; SANTOS, C. O.; OLIVEIRA, L. M.; RIBEIRO, L. A. A.; LIMA, J. T.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. S. Relaxant effect of *Lippia organoides* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels and soluble guanylyl cyclase. **Journal of Ethnopharmacology**. 2018.

MUSHI, M. F.; BADER, O.; TAVERNE-GHADWAL, L.; BII, C.; GRO, U.; MSHANA, S. E. Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals: 10 years of systematic review and meta-analysis from sub-Saharan Africa. **Journal of Oral Microbiology**, 9:1, 2017.

MUZYKA, B. C.; EPIFANIO, R. N. Update on oral fungal infections. **Dent Clin N Am**, v. 57, p. 561-581, 2013.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, **Approved Standard M27-A2**, 2nd ed., 2002.

NICOLIELO, L. F. P.; TINÔCO-ARAUJO, J. E.; CHINELLATO, L. E. M.; SANTOS, P. S.S. Manifestações Orais em Pacientes Portadores da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (Sida/Aids): Uma Revisão Atualizada. **Tese (Doutorado) - Curso de Odontologia**, Faculdade de Odontologia de Bauru, São Paulo, 2013.

OLIVEIRA, T. B; SOUZA, J. S.; GOMES-FILHO, I. S.; MOURA, D.; PEREIRA-FILHO, J. N.; TRINDADE, S. C. O uso da Lippia no tratamento das doenças periodontais. **J Dent Pub H**, v.9, n. 3, p. 227-237, 2018.

OUKERROU, M. A.; TILAOU, M.; MOUSE, H.A.; BOUCHMAA, N.; ZYAD, A. Differential Cytotoxic Activity of Essential Oil of *Lippia citriodora* from Different Regions in Morocco. **Chem Biodivers**. Jul:14, 2017.

PEIXOTO, M.G., BLANK, A.F., ARRIGONI-BLANK, M. de F., GAGLIARDI, P.R., MELO, J.O. de NIZIO, D.A. de C.; PINTO, V.S. Activity of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against phytopathogenic fungi. **Bioscience Journal [online]**, vol. 34, no. 5, pp. 1136–1146, 2018.

PERAZZO, P. S. L.; MARTIN, L. R. L.; MOURA, M. P. C.; MELO, M. A. M.; CARVALHO, M. S. Candidíase laríngea isolada em paciente imunocompetente: relato de caso e revisão literária pertinente. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 70, n. 2, p. 278-282, 2004.

PERES, M. A; MACPHERSON, L. M. D.; WEYANT, R. J.; DALY, B.; VENTURELLI, R.; MATHUR, M. R.; LISTL, S.; CELESTE, R. K.; GUARNIZO-HERREÑO, C. C.; KEARNS, C.; BENZIAN, H.; ALLISON, P.; WATT, R. G. Oral diseases: a global public health challenge. **Lancet**, v. 394, n.10194, p. 249-260, 2019.

PINTO, C. P.; RODRIGUES, V. D.; PINTO, F. P.; PINTO, R. P.; UETANABARO, A. P. T.; PINHEIRO, C. S. R.; GADEA, S. F. M.; SILVA, T. R. S.; LUCCHESI, A. M. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evid Based Complement Alternat Med**, p. 1-5, 2013.

QUINDÓS, G.; ERASO, E.; LÓPEZ-SORIA, L. M.; EZPELETA, G. Invasive fungal disease: conventional or molecular mycological diagnosis?. **Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica**, v. 30, n. 9, p. 560–71. 2012.

RIBEIRO, G. F.; DENES, E.; HEANEY, H.; CHILDERS, D.S. What 'Omics can tell us about antifungal adaptation. **FEMS Yeast Research**, v. 21, q. 8, 2021.

RICOTTA, E. E.; LAI, Y. L.; BABIKER, A.; STRICH, J. R.; KADRI, S. S.; LIONAKIS, M. S.; PREVOTS, D. R.; ADJEMIAN, J. Invasive Candidiasis Species Distribution and Trends, United States, 2009-2017. **J Infect Dis**, v. 223, p. 1295–302. 2020.

ROBBINS, STANLEY L.; COTRAN, RAMZI S.; KUMAR, VINAY; ABBAS, ABUL K.; FAUSTO, N. Robbins e Cotran: patologia: bases patológicas das doenças. 8. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2010.

RODRIGUES, C.; SILVA, S.; HENRIQUES, M. Candida glabrata: a review of its features and resistance. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 33, p. 673-688, 2014.

SALIMENA, F. R. G.; THODE, V., MULGURA, M.; O'LEARY, N. **Verbenaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2011/FB015127>>. Acesso em: 23 novembro 2019.

SANTOS, L. S.; BERNARDES, R. C.; MAGALHÃES, L. M.; SIQUEIRA, F. S., KHOURI, S. Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionais. In: **ENCONTRO LATINO-AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 13 e ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO**, 9. São José dos Campos, 2009.

SANTOS, N. O.; PASCON, R. C.; VALLIM, M. A.; FIGUEIREDO, C. R.; SOARES, M. G.; LAGO, J. H. G.; SARTORELLI, P. Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines**. São Paulo, v. 51, n. 3, p. 352-356, 2016.

SAVASTANO, C.; DE OLIVEIRA SILVA, E.; GONÇALVES, L. L.; NERY, J. M.; SILVA, N. C.; DIAS, A. L. T. *Candida glabrata* among candida spp. from environmental health practitioners of a Brazilian hospital. **Brazilian J Microbiol**, v. 47, p. 367–72, 2016.

SILAO, F. G. S.; JIANG, T.; BERECZKY-VERESS, B.; KÜHBACHER, A.; RYMAN, K.; UWAMOHORO, N.; JENULL, S.; NOGUEIRA, F.; WARD, M.; LION, T.; URBAN, C. F.; RUPP, S.; KUCHLER, K.; CHEN, C.; PEUCKERT, C.; LJUNGDAHL, P. O. Proline catabolism is a key factor facilitating *Candida albicans* pathogenicity. **PLoS Pathog**. 2023.

SILVA, S.; NEGRI, M.; HENRIQUES, M.; OLIVEIRA, R.; WILLIAMS, D. W.; AZEREDO, J. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288-305, 2012

SILVEIRA, R. F. M.; FERREIRA, L. C.; GINANI, F.; BARBOZA, C. A. G.; Influência do protocolo laboratorial no rendimento *in vitro* de células-tronco mesenquimais. **Revista de Ciência Médicas e Biológicas**, Brasil, v.9, n.1, p.17-21, 2010.

SIMÕES, R. J.; FONSECA, P.; FIGUEIRAL, M. H. Infecções por *Candida* spp na Cavidade Oral. **Odontol. Clín.-Cient.**, Recife, v. 12, n.1, p. 19-22, jan./mar., 2013.

SOUZA, A. J; GOMES-FILHO, I. S; SILVA, C. A. L; PASSOS-SOARES, J. S; CRUZ, S. S; TRINDADE, S. C; FIGUEIREDO, A. C. M. G; BUISCHI, Y. P; SEYMOUR, G. J; CERQUEIRA, E. M. M. Factors associated with dental caries, periodontitis and intra-oral lesions in individuals with HIV / AIDS. **AIDS Care**. 2017.

SPALANZANI, R. N.; MATTOS, K.; MARQUES, L. I.; BARROS, P. F. D.; PEREIRA, P. I. P.; PANIAGO, A. M. M.; MENDES, R. P.; CHANG, M. R. Clinical and laboratorial features of oral candidiasis in hiv-positive patients. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 51 n. 03, 2018.

SUZUKI, L. C. Desenvolvimento de biofilme formado por *Candida albicans* in vitro para estudo da terapia fotodinâmica. **Tese (Mestrado em Ciências na área de Tecnologia Nuclear - Matérias) - Instituto de Pesquisas Energéticas Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.**

TRICK, W. E.; FRIDKIN, S. K.; EDWARDS, J. R., HAJJEH, R. A.; GAYNES, R. P. Secular trend of hospital-acquired candidemia among intensive care unit patients in the United States during 1989–1999. **Clin Infect Dis**, v. 35, p. 627–630, 2002.

TRINDADE, S. C. O uso da *Lippia* no tratamento das doenças periodontais. **J Dent Pub H.v** 9, n.3, p.227-237, 2018.

TRINDADE, S. C.; PEREIRA-FILHO, J. N.; BARRETO NETO, L. O.; MOURA, T. B. O.; FARIAS, A. P. F.; ROCHA FILHO, J. T. R. R; SANTOS, R. P. B; MAGALHÃES, A. O.; SANTOS-LIMA, E. K. N; CARVALHO-FILHO, P. C.; VALE, V. L. C.; LUCCHESI, A. M. Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 9, e22610918051, 2021.

URIZAR, J. M. A. Candidiasis orales. **Rev Iberoam Micol**, v. 19, p. 17-21, 2002.

VALLE, G. C.; RENDE, J. C.; OKURA, M. H. Estudo da Incidência do Gênero *Candida* em Hospital Público Universitário. **NewsLab.**, São Paulo, v.17, n.101, p. 202-222, 2010.

VILELA, D. A. D.; SILVA, B. A. O.; BRITO, M. C.; MENEZES, P. M. N.; BOMFIM, H. F.; DUARTE-FILHO, L. A. M. S.; SILVA, T. R. S.; RIBEIRO, L. A. A.; LUCCHESI, A. M.; SILVA, F. S. *Lippia alnifolia* essential oil induces relaxation on Guinea-pig trachea by multiple pathways. **J Ethnopharmacol**, 246, 1-10, 2019.

WARAD, S.; KOLAR, S.; KALBURGI, V.; KALBURGI, N. Lemongrass essential oil gel as a local drug delivery agent for the treatment of periodontitis. **Anc Sci Life**, v. 32, n. 4, p. 205-11, 2013.

APÊNDICE A: Manuscrito submetido à revista *Applied Microbiology And Biotechnology Express*, ISSN 1432-0614.

***Lippia* essencial oils activity on *Candida* infection from lesions of people living with HIV**

Ana Paula Rios Santana de Oliveira^{1,*}, Fernanda Oliveira de Azevedo¹, Antonio Pedro Fróes de Farias², Rebeca Pereira Bulhosa Santos³, Yuri Andrade de Oliveira⁴, Larissa Miranda Santos Matos⁵, Liliane Lins Kusterer⁶, Viviane Almeida Sarmiento⁶, Maria da Conceição Aquino de Sá⁶, Angélica Maria Lucchese⁷, Soraya Castro Trindade⁷.

1. Master's student in the Biotechnology Graduate Program, State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil;
2. Postdoctoral Researcher at the Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil;
3. PhD Immunology Graduate Program, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil;
4. PhD student in the Biotechnology Graduate Program, State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil;
5. PhD in Biotechnology from the State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil;
6. Professor at the Federal University of Bahia, Salvador, Brazil, Brazil;
7. Professor in Biotechnology Graduate Program, State University of Feira de Santana, Feira de Santana, Bahia, Brazil.

***Corresponding author:** Ana Paula Rios Santana de Oliveira. paulariosoliveira@hotmail.com
<https://orcid.org/0000-0003-0236-7466>

Abstract

Candidiasis is an opportunistic disease caused by fungi of the genus *Candida*, resulting from a dysbiosis of the oral or intestinal microbiome. This disease is highly prevalent in people living with HIV and serves as a marker of progression to AIDS in individuals not undergoing antiretroviral treatment. Different plant species of the genus *Lippia* have raised scientific interest due to their biological activity with immunomodulatory and antimicrobial properties and their potential use as a therapeutic alternative for controlling and treating candidiasis. Therefore, this study aimed to assess the antifungal action of essential oils of *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer and *L. organoides* Kunth, which are rich in carvone and carvacrol, respectively, on *Candida* fungi isolated from lesions of people living with HIV. The antifungal activity was determined using the minimum inhibitory concentration (MIC) method. The evaluated essential oils showed antifungal activity against *Candida albicans* and *C. glabrata* when used at concentrations equal to or less than 0.5%, which denotes that they are promising alternatives for treating infectious diseases of fungal origin.

Key Points

- The essential oils of *Lippia alnifolia* and *L. organoides* are not cytotoxic.
- *Lippia alnifolia* and *L. organoides* essential oils are antifungal against species of *Candida*.
- Both essential oils are viable alternatives for the treatment of candidiasis.

Keywords: *Lippia alnifolia*. *Lippia organoides*. Candidiasis. Antifungal action. HIV.

INTRODUCTION

Candidiasis is a disease caused by fungi of the genus *Candida* and results from an imbalance disruption in the oral or intestinal microbiome. It results from an opportunistic infection with a high prevalence among people living with HIV (Arya and Naureen 2019). Oral candidiasis presents in several clinical forms; the pseudomembranous form is the most common in immunosuppressed patients, although it can also affect individuals with a healthy immune system (Baumgardner 2019, Arya and Naureen 2019).

A significant challenge in treating lesions caused by species of the genus *Candida* is the resistance to conventional antifungal medications (Arendrup and Patterson 2017). *Candida albicans* accounts for 60% of all oral mucosa infections causing candidiasis, but infections caused by *C. glabrata* are clinically significant due to its resistance to azole drugs (Abdehgah et al 2017). Therefore, the use

of natural products could be a promising alternative for the treatment of candidiasis, especially in people living with HIV.

Plants species from the genus *Lippia* have several therapeutic properties and are used in folk medicine to treat various illnesses, including oral cavity conditions (Oliveira et al 2018). *Lippia alnifolia* Mart. & Schauer possesses antioxidant, anti-inflammatory, analgesic, anticancer, antifungal, antibacterial, and larvicidal, and antifungal properties, among others (Figueiredo et al 2008). *Lippia organoides* Kunth is a medicinal shrub composed of thymol or a mixture of thymol and carvacrol, which are agents with antimicrobial properties (Trindade et al 2021, Adams 2007).

Some biological properties of essential oils from plants of *Lippia* spp. have been documented (Oliveira et al 2018), which reinforces their potential for use as herbal medicines. However, there is a lack of information in the scientific literature about their antifungal activity, especially against pathogenic wild strains. Therefore, this study aimed to assess the antifungal action of essential oils of *Lippia alnifolia* and *L. organoides* on *Candida* fungi isolated from lesions of people living with HIV.

MATERIALS AND METHODS

Essential oils

The essential oils of *Lippia alnifolia* and *Lippia organoides* used in the tests of this study were extracted from leaves of plants originating from the municipalities of Rio de Contas and Feira de Santana, respectively, Bahia, Brazil. The collection, extraction, and chemical identification of these essential oils were previously described (Vilela et al 2019, Menezes et al 2018). The primary component found in the essential oil of *L. alnifolia* used in this experiment was carvone (60.0%), followed by limonene (6.1%), δ -cadinene (5.0%), α -copaene (3.8%), and germacrene D (3.5%) (Vilela et al 2019). The primary component found in the essential oil of *L. organoides* was carvacrol (53.89%), followed by E-caryophyllene (5.86%), linalool (5.84%), bicyclogermacrene (4.16%), p-cymene (4.03%), and thymol (4.0%) (Menezes et al 2018).

Preparation of essential oils for the tests

The essential oils of *L. alnifolia* and *L. organoides* were diluted in a solution with methanol and 3% dimethyl sulfoxide (DMSO) (1:3) and then filtered with a sterile 0.22 μ m membrane to obtain aliquots for the tests.

Acquisition of fungal samples

Selection of participants

A total of 16 individuals over 18 years old with a positive HIV diagnosis were selected for this study at the Professor Edgard Santos University Hospital (HUPES), Bahia, Brazil. The study was approved by the Research Ethics Committee (HUPES-Federal University of Bahia, Approval no. 1.035.826); all participants signed the informed consent form. Smokers and individuals with any temporary or permanent incapacity to respond to the anamnesis were excluded during the selection process.

Diagnosis of oral candidiasis and sample collection

Samples were collected from lesions detected on the oral mucosa using a sterile swab, transferred to tubes containing Sabouraud dextrose agar medium, and transported under refrigeration to the Oral Biology Laboratory (LABOR), where the tests were conducted (Muzyka and Epifanio 2013, O'donnell et al 2015).

The diagnosis of candidiasis involved the clinical analysis of lesions associated with exfoliative cytology, followed by culture to identify the microorganism in the collected samples (Hellstein and Marek 2019).

Isolation and biochemical identification of fungi

The samples were plated using the streaking exhaustion technique on selective medium for fungal species of the genus *Candida*. The fungal isolates were activated on Sabouraud dextrose agar

medium at 37 °C for 48 hours. Fungi were identified by urease, sucrose, maltose, lactose, trehalose, xylose, nitrate, and glucose tests conducted after growth.

Essential oil cytotoxicity test

An MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] assay was conducted in triplicate to determine the concentration of essential oils with low cytotoxicity potential. Initially, peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected from a volunteer and distributed in 96-well plates containing RPMI culture medium with 1% antibiotic/antimycotic and 10% fetal bovine serum at a concentration of 106 cells well⁻¹. PBMCs were cultured under the following stimulation conditions: 1- PBMCs in RPMI medium with 3% DMSO (the essential oil diluent), used as the negative control (blank); 2- culture medium with addition of 50% DMSO, used as the positive control; 3- culture medium with addition of essential oils of *L. alnifolia* and *L. origanoides* at different concentrations (1%, 0.5%, 0.25%, and 0.125%). The plates were incubated at 37 °C for 48 hours in a humidified chamber with 5% CO₂ atmosphere; the plates were shaken for 2 minutes. Subsequently, 9 µL of a MTT solution (Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, USA) were added to each well.

The cells were incubated again for 4 hours at 37 °C in a humidified chamber with 5% CO₂ atmosphere. The culture medium was then removed; the resulting formazan crystals were dissolved by adding 90 µL of the solubilization solution from the MTT kit (M-8910), using a pipette. Each well was homogenized for absorbance readings on a microplate reader at a wavelength of 570 nm. Compounds that allowed for cell viability of 90% or higher were considered non-toxic (Silveira et al 2010).

Determination of essential oil antimicrobial activity

The antimicrobial activity of the essential oils was determined by an antibiogram, using the minimum inhibitory concentration (MIC) technique through the broth microdilution method, according to the M100-S15 Standard of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2005).

In addition to the fungi isolated from HIV patients, two commercial strains from the André Tosello Foundation culture catalog were used: *Candida albicans* ATCC 10321 and *Candida glabrata* ATCC 15261.

The different *Candida* strains were activated in Sabouraud dextrose broth and incubated at 37 °C for 48 hours. Subsequently, subculture on Sabouraud dextrose agar medium was performed and subjected to incubation at 37 °C for 48 hours. Colonies were then transferred to tubes containing 4.5 mL of saline solution (0.85%), homogenized, and then compared to the 0.5 standard tube of the McFarland scale ($\sim 1 \times 10^3$ UFC mL⁻¹) for standardization. Confirmation was done by reading on a spectrophotometer (Polaris, Celer Biotecnologia S.A., Belo Horizonte, Brazil) at 625 nm, according to the NCCLS document M27-A2—Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard—Second Edition (NCCLS, 2002).

The antimicrobial activity assay was conducted in sterile 96-well plates, in triplicate, with the addition of 90 µL well⁻¹ of Sabouraud dextrose culture medium and 100 µL well⁻¹ of the different concentrations of essential oil (1%, 0.5%, 0.25%, and 0.125%), which were obtained through successive serial dilutions (1:1); 3% DMSO and Ciclopirox olamine (5 mg mL⁻¹) were used as controls. An aliquot of 10 µL of the different samples of *C. glabrata* and *C. albicans* ($\sim 1 \times 10^3$ UFC mL⁻¹) was distributed in each well, except in the blank control (only 200 µL of broth per well). After inoculation, the plates were incubated in a bacteriological incubator at 37 °C for 48 hours.

All wells that did not show fungal growth after the incubation period were subcultured to confirm the antifungal activity. An aliquot of 1 µL of the sample was taken, seeded on a Petri dish with Sabouraud dextrose agar, and incubated at 37 °C for 48 hours, in triplicate. Subsequently, the minimum antifungal concentration was defined as the lowest concentration of the essential oil capable of causing the death of the fungus, with no visible growth of any fungal colony.

Statistical analysis

The cytotoxicity analysis involved calculating the percentage of cell death and comparing it with the controls; essential oil concentrations that showed up to 90% cell viability (compared to the negative control) were considered non-toxic. Subsequently, the normality of the data was tested using the Kolmogorov-Smirnov test, followed by ANOVA and post-hoc Dunnett test. A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant. The antifungal activity was determined through descriptive analysis of the results.

RESULTS

Isolation and biochemical identification of fungi

Biochemical identification of the fungal isolates is shown in Table 1. The tests performed after the fungal cultures for identification of growth halos resulting from carbohydrate fermentation and assimilation of carbon sources, as well as for morphological characterization of fungi, indicated a total of nine fungal isolates: six were *Candida albicans* and the remaining three were *C. glabrata*.

Six strains of *C. albicans* were identified, but strains 1 and 6 differed from the others and from each other in terms of assimilation of carbon sources. The three identified strains of *C. glabrata* showed differences in assimilation of carbon sources. Regarding the carbohydrate fermentation pattern, all strains of both species exhibited similar behavior.

Essential oil cytotoxicity

The results of the cytotoxicity test for essential oils from leaves of *Lippia alnifolia* and *L. origanoides* are shown in Figure 1.

All tested concentrations of essential oils of *L. alnifolia* and *L. origanoides* were non-toxic to peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), as they allowed for cell viability of 90% or higher. The comparison of absolute optical density values showed that all concentrations did not differ significantly from the negative control (blank). Data analysis showed a lymphoproliferative effect of both essential oils at all tested concentrations when compared to the positive control. The effect of essential oil of *L. origanoides* showed a negative dose-dependent relationship, i.e., the lower the concentration, the higher the proportion of viable cells.

Essential oil antimicrobial activity

The results of the microbial inhibition test for essential oils from leaves of *L. alnifolia* and *L. origanoides* are shown in Table 2.

The essential oil of *Lippia alnifolia* (EOLA) exhibited antifungal activity against all tested strains of *C. albicans* and *C. glabrata*, with minimum inhibitory concentration (MIC) ranging from 0.125% to 10%. A similar result was found for the essential oil of *L. origanoides* (EOLO), which also inhibited all evaluated *Candida* strains, whether wild or commercial, with MIC ranging from 0.25% to 0.5%. The tested essential oils demonstrated antifungal activity through the MIC test. Regarding the strains of *C. glabrata*, EOLA presented MIC ranging from 0.125% (strain 03) to 0.5% (strain 01), whereas for the strains of *C. albicans*, the MIC ranged from 0.5% (strain 05) to 10% (strain 06). EOLO showed antifungal activity with an MIC of 0.25% for most strains of *C. glabrata*, except for strain 01, for which the MIC was 0.5%. Regarding antifungal effect of EOLO on the strains of *C. albicans*, the MIC was 0.25% for all strains, except for strain 03, which was inhibited with an MIC of 0.5%.

DISCUSSION

The essential oils of *Lippia alnifolia* (EOLA) and *L. origanoides* (EOLO), extracted from leaves, inhibited the in vitro growth of fungi of the species *Candida glabrata* and *C. albicans*, which are microorganisms typically found in oral cavities, but are associated with dysbiosis in immunosuppressed individuals, causing oral candidiasis. The main significance of these findings is related with the resistance of some causative agents of these infections to treatment with azole drugs (Abdehghah et al 2017, Mushi et al 2017). Additionally, considering that antifungals of the nystatin and miconazole classes (topical action) are less effective, systemic antifungals are the best therapeutic option for this group of patients, but they present limitations, including hepatic toxicity (Freitas et al 2018, Santos et al 2009).

The antifungal action of *Lippia* spp. has been reported in the scientific literature (Santos et al 2016, Oliveira et al 2018, Trindade et al 2021), however, these studies mainly use commercial strains, which generally have attenuated virulence (Freitas et al 2018). Thus, the present study significantly contributes to the existing literature by providing information about the antifungal activity of essential oils from two *Lippia* species against wild strains of *C. albicans* and *C. glabrata*, which were collected from oral candidiasis lesions in people living with HIV. The tests conducted in the present study allowed for the evaluation of the effects of these essential oils on virulence factors expressed by these fungi under natural infection conditions.

C. albicans and *C. glabrata* are part of the healthy oral and intestinal microbiome; however, any condition of immunosuppression can lead to local infection and its spread to the bloodstream (Arya and Naureen 2019). Thus, individuals with any condition of immunosuppression can benefit from the use of the evaluated essential oils, especially considering their predisposition to candidiasis and other oral complications (Oukerrou et al 2017, Kumar et al 2014, Souza et al 2017).

The mechanisms of action of essential oils may be associated with the action of their primary compounds, such as carvone (EOLA) (Vilela et al 2019) and carvacrol (EOLO) (Menezes et al 2018). However, the contribution of other components in these essential oils should not be disregarded. Several of these mechanisms of action appear to be directed at the fungal cell membrane, inhibiting the synthesis of ergosterol and chitin, which are components that regulate cell permeability and integrity (Peixoto et al 2018, Cadena et al 2021). Other mechanism of action may be the lipid oxidation of cell membranes, changing their selectivity and consequently affecting cell metabolism (Garcia et al 2008, Peixoto et al 2018).

The susceptibility of microorganisms is also an important factor, as the minimum inhibitory concentrations (MIC) of the evaluated essential oils varied according to the tested strains. Strain 06 of *C. albicans* required a higher MIC of EOLA, showing a different pattern of carbon source assimilation from the other strains, indicating the presence of diverse biotype.

Another significant finding for the clinical applicability of the studied essential oils was the absence of toxicity to human cells. This can be attributed to the low MIC found for almost all strains (except for the MIC of EOLA on strain 06 of *C. albicans*), indicating the safety of using the essential oils, as previously reported (Oliveira et al 2018, Trindade et al 2021). However, preclinical assays should be performed to confirm these findings in more complex systems.

Although the present study found antifungal action of the essential oils at very low concentrations, these oils stimulated the in vitro proliferation of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs), which is information not yet found in the literature. The dynamics of in vitro proliferation of human PBMCs in the presence of the essential oils differed between EOLA and EOLO, which can be attributed to differences in their compositions, mainly regarding their primary components: carvone (EOLA) and carvacrol (EOLO). Furthermore, other terpenes are present in both essential oils, increasing the differences in their compositions (Menezes et al 2018, Vilela et al 2019).

These findings contribute to new perspectives in the field of therapies based on plant natural products, as the induction of proliferation of immune system cells is desirable for the control of viral infections and tumor cells. However, further investigations are needed to identify the proliferating cell type and its phenotypic profile regarding effector activity. Furthermore, these data should be interpreted with caution, as they result from in vitro assays.

It is important to highlight the method used for fungal identification, which consisted of a combination of tests for assimilation of carbon source and carbohydrate fermentation with morphological characterization of the fungi, allowing for a better identification of genus and species. Therefore, the antifungal activity of the tested essential oils can be considered promising for the treatment of oral candidiasis. In vivo studies should be conducted to determine the appropriate concentration and vehicles for the administration of these essential oils, such as mouthwashes, membranes, creams, and ointments.

The evaluated essential oils from leaves of *Lippia alnifolia* and *L. organoides* were effective in the in vitro control of wild strains of *Candida albicans* and *C. glabrata*. The essential oil of *L. organoides* at lower concentrations was effective against all tested *Candida* strains. Both essential oils are viable alternatives for the treatment of candidiasis.

DECLARATIONS

Ethics approval

All applicable national and institutional guidelines for human studies were followed. All human procedures were performed in accordance with the recommendations of the Ethics and Research Committee of the HUPES-Federal University of Bahia, under protocol number CAEE: 42996315.9.0000.5577.

Consent to participate

Declare that all the researchers cited in this manuscript have consented to the participation in the work.

Availability of data and material

The data of this work are available at: <http://www.labimuno.ufba.br/>

Competing interests

Author 1 declares that she has no conflict of interest. Author 2 declares that she has no conflict of interest. Author 3 declares that he has no conflict of interest. Author 4 declares that he has no conflict of interest. Author 5 declares that he has no conflict of interest. Author 6 declares that she has no conflict of interest. Author 7 declares that she has no conflict of interest. Author 8 declares that she has no conflict of interest. Author 9 declares that she has no conflict of interest. Author 10 declares that he has no conflict of interest. Author 11 declares that he has no conflict of interest.

Funding

Not applicable.

Code availability

Not applicable for that section.

Author Contribution Statement

All authors contributed to the conception and design of the study. Conceptualization, APRSO; methodology, SCT and APFF; sample design, LKL, VAS, MCAS, LMSM and AML; validation, SCT and APFF; formal analysis, APRSO; investigation, APRSO, FOA, YAO and APFF; resources, SCT; data curation, APRSO, SCT and APFF; writing, preparation of original draft, APRSO; writing, reviewing and editing, APRSO, SCT and APFF; visualization, APRSO; supervision, APFF; project administration, SCT; acquisition of financing, SCT. All authors read and agreed to the published version of the manuscript.

Acknowledgments

The authors are sincerely grateful to the technical staff of the University Hospital Professor Edgard Santons - Laboratory of Immunology Federal University of Bahia, Salvador, Brazil; to the Postgraduate Program in Biotechnology and to the Multidisciplinary Research and Integrated Practice Center (NUPPIIM) - Feira de Santana State University, Feira de Santana, Brazil. This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

REFERENCES

- Abdehghah, I. B.; Alireza, K.; Shamsazar, A; Negahdary, M; Jafarzadeh, M; Rahimi, G. (2017) In vitro antifungal effects of biosynthesized silver nanoparticle by *Candida albicans* against *Candida glabrata*. Biomedical Research-Tokyo, v. 28, n. 7, p. 2870-2876.
- Adams RP (2007) Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. J Am Soc Mass Spectrom 16(11):1902-1903. doi: 10.1016/j.jasms.2005.07.008.
- Arendrup, M. C.; Patterson, T. F. (2017) Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. J Infect Dis, v. 216, n. 3, p. 445-451. doi: 10.1093/infdis/jix131
- Arya, N. R.; Naureen, B. R. (2019) Candidiasis. Last update: fevereiro 19, 2022. Available from: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK560624/> >. Acesso em: fevereiro 19, 2022. In: StatPearls [Internet]. PMID: 32809459.

- Baumgardner, D. J. (2019) Oral fungal microbiota: to thrush and beyond. *J Patient Cent Res Rev*, v. 6, p. 252-261. doi: 10.17294/2330-0698.1705.
- Cadena K, M; Arias C. M; Mateo, E; Aguirre-Urizar, Jm; Quindós, G; Eraso, E. (2021) In vitro activities of carvacrol, cinnamaldehyde and thymol against *Candida* biofilms. *Biomed Pharmacother*. doi: 10.1016/j.biopha.2021.112218.
- Figueiredo, A. C. Barroso, J. G.; Pedro, L. G.; Johannes J. C. Scheffer. (2008) Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag J*, v. 23, p. 213-226. doi.org/10.1002/ffj.1875.
- Freitas, M.; Machado, A.; Doria, A.; Hage, R.; Khouri, S. (2018) Padronização da metodologia utilizando terapia fotodinâmica sobre cepa de *Candida albicans* isolada de cateter. In: encontro latino americano de iniciação científica, 18; encontro latino americano de pós- graduação, 14 e encontro de iniciação à docência, 4. São José dos Campos. doi :10.18066/revistaunivap.v24i44.380.
- Garcia, R; Alves, E. S; Santos, M. P; Aquije, G. M; Fernandes, A. A; Dos Santos, R. B; Ventura, J. A; Fernandes, P. M. (2008) Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J Microbiol*. 39(1):163-8. doi: 10.1590/S1517-838220080001000032.
- Hellstein, J. W; Marek, C. L. (2019) Candidiasis: red and white manifestations in the oral cavity. *Head Neck Pathology*, v. 13, n. 1, p. 25-32. doi: 10.1007/s12105-019-01004-6.
- Kumar, V., Abbas, A. K., & Aster, J. C. (2014) Robbins and Cotran pathologic basis of diseases (9th ed.). Philadelphia: Elsevier Saunders. eBook ISBN: 9780323609937.
- Menezes, P. M. N; Brito, M. C; Paiva, G. O; Santos, C. O; Oliveira, L. M; Ribeiro, L. A. A; Lima, J. T; Lucchese, A. M; Silva, F. S. (2018) Relaxant effect of *Lippia origanoides* essential oil in guinea-pig trachea smooth muscle involves potassium channels and soluble guanylyl cyclase. *Journal of Ethnopharmacology*, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.03.040>.
- Mushi, M.F; Bader, O; Taverne-Ghadwal, L; Bii,C; Gro, U. & Mshana, S. E. (2017) Oral candidiasis among African human immunodeficiency virus-infected individuals: 10 years of systematic review and meta-analysis from sub-Saharan Africa, *Journal of Oral Microbiology*, 9:1, 1317579, DOI: 10.1080/20002297.2017.1317579
- Muzyka BC, Epifanio RN (2013) Update on oral fungal infections. *Dent Clin N Am* 57(4):561-81. doi: 10.1016/j.cden.2013.07.002.
- O'Donnell LE, Robertson D, Nile CJ, Cross LJ, Riggio M, Sherriff A, Bradshaw D, Lambert M, Malcolm J, Buijs MJ, Zaura E, Crielaard W, Brandt BW, Ramage G. (2015) The Oral Microbiome of Denture Wearers Is Influenced by Levels of Natural Dentition. *PLoS One*.14;10(9):e0137717. doi: 10.1371/journal.pone.0137717.
- Oliveira TB, souza JS, Gomes-Filho IS, Moura D, Pereira-Filho JN, Trindade SC. (2018) O uso da *Lippia* no tratamento das doenças periodontais. *J Dent Pub H.v* 9, n.3, p.227-237. <https://doi.org/10.17267/2596-3368dentistry.v9i3.1985>
- Oukerrou MA, Tilaoui M, Mouse HA, Bouchmaa N, Zyad A. (2017) Differential Cytotoxic Activity of Essential Oil of *Lippia citriodora* from Different Regions in Morocco. *Chem Biodivers* Jul;14. doi: 10.1002/cbdv.201600497.
- Peixoto, M.G., Blank, A.F., Arrigoni-Blank, M. de F., Gagliardi, P.R., Melo, J.O. de, Nizio, D.A. de C. and PINTO, V.S., (2018) Activity of essential oils of *Lippia alba* chemotypes and their major monoterpenes against phytopathogenic fungi . *Bioscience Journal* [online], vol. 34, no. 5, pp. 1136–1146. DOI 10.14393/BJ-v34n5a2018-39385.
- Santos, L. S.; Bernardes, R. C.; Magalhães, L. M.; Siqueira, F. S., Khouri, S. (2009) Perfil de sensibilidade de amostras isoladas de casos de candidurias hospitalares aos antifúngicos convencionais. In: encontro latino americano de iniciação científica, 13 e encontro latino americano de pós-graduação, 9. São José dos Campos.
- Santos, N. O., Pascon, R. C., Vallim, M. A., Figueiredo, C. R., Soares, M. G., Lago, J. H. G., & SARTORELLI, P. (2016) Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). *Medicines*, 3(22), 1-9. doi: 10.3390/medicines3030022.

Silveira, R. F. M.; Ferreira, L. C.; Ginani, F.; Barboza, C. A. G. (2010) Influência do protocolo laboratorial no rendimento in vitro de células-tronco mesenquimais. *Revista de Ciência Médicas e Biológicas*, Brasil, v.9, n.1, p.17-21. doi: <https://doi.org/10.9771/cmbio.v9i1.4635>.

Souza, A. J; Gomes-Filho, I. S; Silva, C. A. L; Passos-Soares, J. S; Cruz, S. S; Trindade, S. C; Figueiredo, A. C. M. G; Buischi, Y. P; Seymour, G. J & Cerqueira, E. M. M. (2017) Factors associated with dental caries, periodontitis and intra-oral lesions in individuals with HIV / AIDS. *AIDS Care*. doi: 10.1080/09540121.2017.1400640.

Trindade SC, Pereira-Filho JN, Barreto Neto LO, Moura TBO, Farias APF, Rocha Filho JTRR, Santos RPB, Magalhães AO, Santos-Lima EKN, Carvalho-Filho PC, Vale VLC, Lucchese AM (2021). Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*. *Res Soc Dev* 10(9):98-107. doi:10.33448/rsd-v10i9.18051

Vilela, D. A. D., Silva, B. A. O., Brito, M. C., Menezes, P. M. N., Bomfim, H. F., Duarte-Filho, L. A. M. S., Silva, T. R. S., Ribeiro, L. A. A., Lucchese, A. M., & Silva, F. S. (2019) *Lippia alnifolia* essential oil induces relaxation on Guinea-pig trachea by multiple pathways. *J Ethnopharmacol*, 246, 1-10. doi: 10.1016/j.jep.2019.112162.

Table 1. Identification of fungal isolates by carbohydrate fermentation and assimilation of carbon sources.

Isolate	Carbohydrate fermentation		Assimilation of carbon sources									Microorganism
	Glu	Lac	Xyl	Ure	Tre	Raf	Mal	Ino	Glu	Lac	Suc	
1 Ca	+	–	–	+	+	+	+	+	+	+	+	<i>Candida albicans</i>
2 Ca	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	<i>C. albicans</i>
3 Ca	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	<i>C. albicans</i>
4 Ca	+	–	–	+	+	+	+	+	+	–	+	<i>C. albicans</i>
5 Ca	+	–	–	+	+	+	+	–	+	–	+	<i>C. albicans</i>
6 Ca	+	–	+	–	+	+	+	–	+	–	+	<i>C. albicans</i>
1 Cg	+	–	+	+	+	+	+	+	+	–	+	<i>C. glabrata</i>
2 Cg	+	–	+	+	+	+	–	+	+	–	+	<i>C. glabrata</i>
3 Cg	+	–	–	–	+	+	+	+	+	–	+	<i>C. glabrata</i>

Xyl = xylose; Ure = urea; Tre = trehalose; Raf = raffinose; Mal = maltose; Ino = inositol; Glu = glucose; Lac = lactose; Suc = sucrose. + = Positive; – = Negative.

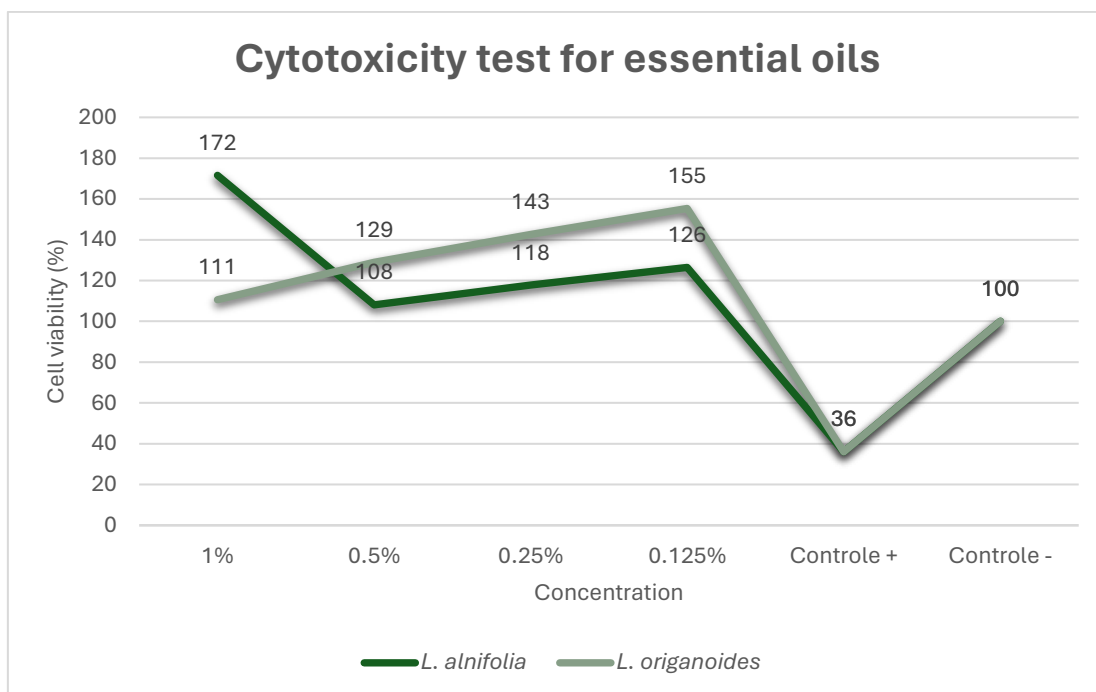


Figure 4 - Cytotoxicity of essential oil of *Lippia alnifolia* and *Lippia organoides* at different concentrations. + Control (positive control = culture medium + 50% DMSO); – Control (negative control = culture medium + 3% DMSO).

Table 2 - Minimum inhibitory concentration (MIC) of essential oils of *Lippia alnifolia* and *L. organoides* against different strains of *Candida glabrata* and *C. albicans*.

Microorganism	<i>L. alnifolia</i>		<i>L. organoides</i>	
	MIC	Effect	MIC	Effect
<i>C. glabrata</i> (ATCC 15261)	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. glabrata</i> 1	0.5%	*	0.5%	*
<i>C. glabrata</i> 2	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. glabrata</i> 3	0.125%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> (ATCC 10321)	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 1	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 2	0.25%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 3	0.25%	*	0.5%	*
<i>C. albicans</i> 4	1%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 5	0.5%	*	0.25%	*
<i>C. albicans</i> 6	10%	*	0.25%	*

* Antifungal effect.