



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

GLEILTON WEYNE PASSOS SALES

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DO
QUIMIOTIPO III (LIMONENO E CARVONA) DE *Lippia alba* (MILL.) N. E.
BROWN

FORTALEZA

2022

GLEILTON WEYNE PASSOS SALES

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DO
QUIMIOTIPO III (LIMONENO E CARVONA) DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Nádia Acioly Pinto Nogueira.

FORTALEZA

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Sistema de Bibliotecas

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S155p Sales, Gleilton Weyne Passos.
Potencial antifúngico e modulador do óleo essencial do quimiotipo III (limoneno e carvona) de *Lippia alba* (MILL.) N. E. Brown. / Gleilton Weyne Passos Sales. – 2022.
- 115 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Fortaleza, 2022.
Orientação: Prof. Dr. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz.
Coorientação: Prof. Dr. Nádia Acioly Pinto Nogueira.
1. Lippia. 2. Óleos voláteis. 3. Candida. 4. Sinergismo farmacológico. I. Título.
-

CDD 615

GLEILTON WEYNE PASSOS SALES

POTENCIAL ANTIFÚNGICO E MODULADOR DO ÓLEO ESSENCIAL DO
QUIMIOTIPO III (LIMONEMO E CARVONA) DE *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Ceará, como requisito para a obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Biologia para a Saúde.

Aprovada em ____ / ____ / ____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Nádia Accioly Pinto Nogueira (Co-orientadora)
Externo a instituição

Prof^a. Dr^a. Mary Anne Medeiro Bandeira
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof. Dr. Tiago Lima Sampaio
Universidade Federal do Ceará – UFC

Prof^a. Dr^a. Suelen Carneiro de Medeiros
EMBRAPA

Em memória dos meus avós queridos
Raimundo Antônio das Chagas e Terezinha
Pautilha dos Passos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por me proporcionar inteligência, saúde e pela força que me fez chegar até aqui.

À Profa. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz por todo apoio, encorajamento e por nunca deixar de acreditar em mim.

À Nádia Accioly Pinto Nogueira por todos os ensinamentos, dedicação, paciência e apoio na execução deste trabalho.

À minha mãe Narazé dos Passos e meu irmão Gleyson Weyne que foram e sempre serão meu porto seguro nos momentos mais tempestuosos e de aflição.

À minha tia Neuraci dos Passos por toda a ajuda e o apoio prestado durante esta jornada.

À excelente equipe de amigos e parceiros do LabMicro, Suelen Carneiro de Medeiros, Andressa Hellen de Moraes Batista, Fabrício César Fernandes, Luciana Siebra, Hilania Valéria Dodou, Matheus Lima Rodrigues e Pedro Igor de Oliveira Pereira por toda ajuda e compreensão.

Aos meus amigos Nani, Mimi, Suelen Carneiro de Medeiros, Kharla Rabelo, Igor Lima Soares e Paulo Fernandes pela amizade indispensável durante esta caminhada.

À funcionária do Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos, Amélia Ramos Freire pela obtenção do óleo essencial de *Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN.

Ao PADETEC pela análise e caracterização do óleo essencial.

Aos professores Dra. Mary Anne Medeiros Bandeira, Dr. Tiago Lima e Dra. Suelen Carneiro de Medeiros por aceitarem o convite de participação da banca e pelas considerações acerca deste trabalho.

À Maxwilliam Rodrigues e Juliana Isaias, secretários da Pós-Graduação, pela disponibilidade e atenção no decorrer do curso.

À CAPES pelo apoio financeiro para realização deste trabalho.

Agradeço a todos aqueles que, de forma direta e indireta, contribuíram para o meu crescimento e formação pessoal e profissional. Muito obrigado!

“Não é o quanto fazemos, mas quanto amor colocamos naquilo que fazemos. Não é o quanto damos, mas quanto amor colocamos em dar.” (Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

As doenças fúngicas e a resistência aos antifúngicos são uma ameaça ao mundo moderno, sendo a fitoterapia uma alternativa utilizada pela medicina popular para o combate a infecções. Entre as espécies se destaca a *Lippia alba* (erva-cidreira), que é utilizada na medicina tradicional para tratar indigestão, doenças respiratórias, ansiedade, dores, inflamações, febre e hipertensão. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antifúngica do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. (OELaIII), seu efeito modulador sobre antifúngicos de uso clínico, além do mecanismo de ação sobre cepas de referência de *Candida* (*C. albicans* ATCC 64124, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 90029, *C. albicans* ATCC 44858, *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* ATCC 90018). Para a avaliação da atividade antifúngica foram determinadas as Concentrações Inibitória (CIM) e Letal Mínimas (CLM) do OELaIII, o efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana, o efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos de uso clínico. Para o mecanismo de ação do OELaIII foram determinadas a liberação de material genético, a liberação de proteínas e os mecanismos de ação do sorbitol e ergosterol. Também foi avaliada a ação de concentrações do OELaIII sobre a atividade fatores de virulência (biofilme, proteinase e lipase) e sua atividade hemolítica. O resultado da análise do OELaIII indicou a presença de 11 constituintes, com predominância de carvona (58,15%) e limoneno (25,37%). OELaIII foi capaz de inibir o crescimento de todos os microrganismos testados, com CIM e CLM variando de 0,078 a 1,25 mg/mL, e CIMB e CMEB variando de 0,156 a 5 mg/mL. O ensaio do tempo de exposição demonstrou que OELaIII foi capaz de eliminar todas as cepas num intervalo de duas horas de exposição. O OELaIII apresentou diferentes perfis de modulação em associação com os antifúngicos de uso clínico, sendo a melhor associação observada para a combinação com cetoconazol. OELaIII foi capaz de promover a perda de material citoplasmático (ácidos nucleicos e proteínas), com lise do envoltório celular e moderada atividade hemolítica. Os resultados do estudo indicam que OELaIII tem um excelente potencial antifúngico, com mecanismo fungicida e fungistático baseado no rompimento do envoltório microbiano, além de apresentar um excelente efeito modulador quando associado ao antifúngico cetoconazol.

Palavras-chave: *Lippia*; óleos voláteis; *Candida*; sinergismo farmacológico.

ABSTRACT

Fungal diseases and resistance to antifungal drugs are a threat to the modern world, and phytotherapy is an alternative used in folk medicine to combat infections. Among the species stands out *Lippia alba* (lemon balm), which is used in traditional medicine to treat indigestion, respiratory diseases, anxiety, pain, inflammation, fever and hypertension. The aim of this study was to evaluate the antifungal activity of the essential oil from the leaves of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. chemotype III (limonemo and carvone) (OELaIII). Brown. (OELaIII), its modulatory effect on antifungals of clinical use, as well as the mechanism of action on *Candida* reference strains (*C. albicans* ATCC 64124, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 90029, *C. albicans* ATCC 44858, *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* ATCC 13803 and *C. parapsilosis* ATCC 90018). For the evaluation of the antifungal activity, the Inhibitory Concentration (MIC) and the Minimum Lethal Concentration (MLC) of OELaIII, the effect of the exposure time to OELaIII on microbial viability, the modulating effect of OELaIII on the activity of clinical use antifungals were determined. For the mechanism of action of OELaIII, the release of genetic material, the release of proteins and the mechanisms of action of sorbitol and ergosterol were determined. The action of OELaIII concentrations on the virulence factors activity (biofilm, proteinase and lipase) and its hemolytic activity were also evaluated. The result of the analysis of OELaIII indicated the presence of 11 constituents, with predominance of carvone (58.15%) and limonene (25.37%). OELaIII was able to inhibit the growth of all microorganisms tested, with MIC and CLM ranging from 0.078 to 1.25 mg/mL, and CIMB and CMEB ranging from 0.156 to 5 mg/mL. The exposure time assay demonstrated that OELaIII was able to eliminate all strains within two hours of exposure. OELaIII showed different modulation profiles in association with clinically used antifungal drugs, the best association being observed for the combination with ketoconazole. OELaIII was able to promote the loss of cytoplasmic material (nucleic acids and proteins), with lysis of the cell envelope and moderate hemolytic activity. The results of the study indicate that OELaIII has an excellent antifungal potential, with fungicidal and fungistatic mechanism based on the disruption of the microbial envelope, besides presenting an excellent modulating effect when associated with the antifungal ketoconazole.

Keywords: *Lippia*; volatile oils; *Candida*; pharmacological synergism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Formas morfológicas da <i>Candida albicans</i>	24
Figura 2 – Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais	28
Figura 3 – <i>Lippia alba</i> (MILL.) N. E. Brown.....	30
Figura 4 – Estratégia experimental	35
Figura 5 – Fluxograma da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OELaIII e ANF	38
Figura 6 – Fluxograma da determinação da Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaIII e ANF	39
Figura 7 – Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana	40
Figura 8 – Fluxograma da avaliação das cepas de <i>Candida</i> quanto à aderência e a formação de biofilme.....	41
Figura 9 – Fluxograma da determinação da Concentração Inibitória Mínima de Formação de Biofilme (CIMB).....	42
Figura 10 – Fluxograma da determinação da Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB).....	43
Figura 11 – Fluxograma da determinação do efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos de uso clínico	44
Figura 12 – Fluxograma do ensaio de detecção da liberação de material genético.....	45
Figura 13 – Fluxograma do ensaio de detecção da liberação de proteínas.....	46
Figura 14– Fluxograma de determinação do ensaio do mecanismo do sorbitol	47
Figura 15 – Fluxograma de determinação do ensaio do mecanismo do ergosterol.....	48
Figura 16 – Fluxograma de Detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias de OELaIII na atividade fatores de virulência microbiana de cepas de <i>Candida</i>	48
Figura 17 – Fluxograma de detecção da atividade hemolítica do OELaIII.....	50
Figura 18 – Cromatograma do OELaIII obtido por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS)	52

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. albicans</i>	56
Gráfico 2 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 90028	56
Gráfico 3 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 90029	57
Gráfico 4 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 44858	57
Gráfico 5 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 10231	58
Gráfico 6 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	58
Gráfico 7 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 750	59
Gráfico 8 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	59
Gráfico 9 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 64124	60
Gráfico 10 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 90028	61
Gráfico 11 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 90029	61
Gráfico 12 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 44858	62
Gráfico 13 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. albicans</i> ATCC 10231	62
Gráfico 14 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	63
Gráfico 15 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. tropicalis</i> ATCC 750	63
Gráfico 16 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	64
Gráfico 17 – Cepas de <i>C. albicans</i> quanto à aderência e formação de biofilme	65
Gráfico 18 – CIMB de OELaIII para <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	66
Gráfico 19 – CIMB de OELaIII para <i>C. albicans</i> ATCC 10231	67
Gráfico 20 – CIMB de OELaIII para <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	67
Gráfico 21 – CMEB do OELaIII para a cepa <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	68
Gráfico 22 – CMEB do OELaIII para a cepa <i>C. albicans</i> ATCC 10231	69
Gráfico 23 – CMEB do OELaIII para a cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	69

Gráfico 24 – Isobolograma mostrando o efeito das associações OELaIII-NIS, na inibição do crescimento de cepa da <i>C. albicans</i> ATCC 64124	71
Gráfico 25 – Isobolograma mostrando o efeito das associações OELaIII-CET, na inibição do crescimento de cepas de <i>Candida</i>	72
Gráfico 26 – Isobolograma mostrando o efeito das associações OELaIII-MIC, na inibição do crescimento de cepas de <i>Candida</i>	74
Gráfico 27 – Isobologramas mostrando o efeito das associações OELaIII-CLO na inibição do crescimento de cepas de <i>Candida</i>	766
Gráfico 28 – Isobologramas mostrando o efeito das associações OELaIII-CIC, na inibição do crescimento de cepas de <i>Candida</i>	788
Gráfico 29 – Isobologramas mostrando o efeito das associações OELaIII-ANFO, na inibição do crescimento de cepas de <i>Candida</i>	79
Gráfico 30 – Isobolograma mostrando o efeito das associações OELaIII-FLU, na inibição do crescimento da cepa <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018.....	800
Gráfico 31 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 10231 exposta a OELaIII.....	811
Gráfico 32 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 90029 exposta a OELaIII.....	811
Gráfico 33 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 90028 exposta a OELaIII.....	822
Gráfico 34 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018 exposta a OELaIII.....	822
Gráfico 35 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 64124 exposta a OELaIII.....	833
Gráfico 36 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 44858 exposta a OELaIII.....	833
Gráfico 37 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 exposta a OELaIII.....	844
Gráfico 38 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 exposta a OELaIII.....	844
Gráfico 39 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 10231 exposta a OELaIII	855

Gráfico 40 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 90029 exposta a OELaIII	855
Gráfico 41 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 90028 exposta a OELaIII	866
Gráfico 42 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018 exposta a OELaIII	866
Gráfico 43 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 64124 exposta a OELaIII..	877
Gráfico 44 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. albicans</i> ATCC 44858 exposta a OELaIII..	877
Gráfico 45 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 750 exposta a OELaIII	888
Gráfico 46 – Liberação de proteínas pela cepa <i>C. tropicalis</i> ATCC 13803 exposta a OELaIII	888
Gráfico 47 - Efeito hemolítico do OELaIII.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Constituintes químicos do OELaIII	53
Tabela 2 – CIM e CLM de OELaIII para cepas de referência de Candida, determinadas pelas técnicas da microdiluição em caldo de cultura e de contagem de células viáveis, respectivamente	54
Tabela 3 – CIM e CLM dos antifúngicos para as cepas de referência de Candida, determinadas pelas técnicas da microdiluição em caldo de cultura e de contagem de células viáveis, respectivamente	55
Tabela 4 – Classificação das cepas de <i>C. albicans</i> quanto à aderência do biofilme	65
Tabela 5 – CIMB do OELaIII para cepas de referência de Candida	66
Tabela 6 – CMEB de OELaIII para cepas padrão de Candida	68
Tabela 7 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica da Nistatina (NIS) sobre cepas de Candida	70
Tabela 8 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Cetoconazol (CET) sobre cepas de Candida	71
Tabela 9 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Miconazol (MIC) sobre cepas de Candida	73
Tabela 10 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Clotrimazol (CLO) sobre cepas de Candida	75
Tabela 11 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Ciclopirox-olamina (CIC) sobre cepas de Candida	77
Tabela 12 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica da Anfotericina B (ANFO) sobre cepas de Candida.....	79
Tabela 13 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Fluconazol (FLU) sobre cepas de Candida	80
Tabela 14 – Ação do sorbitol na atividade antifúngica do OELaIII.....	890
Tabela 15 – Ação do Ergosterol na atividade antifúngica do OELaIII	890
Tabela 16 – Efeito de concentrações sub-inibitórias do OELaIII sobre a atividade proteinase de cepas de Candida	901
Tabela 17 – Efeito de concentrações sub-inibitórias do OELaIII sobre a atividade fosfolipase de cepas de Candida	912

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AF	Atividade da fosfolipase
ANF	Antifúngico
ANFO	Anfotericina
ANOVA	Análise da Variação
AP	Atividade da proteinase
APC	Ágar Plate Count
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
°C	Graus Celsius
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. tropicalis</i>	<i>Candida tropicalis</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CET	Cetoconazol
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
CIC	Ciclopirox-olamina
CIM	Concentração inibitória mínima
CIMB	Concentração inibitória mínima do biofilme
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CLM	Concentração letal mínima
CLO	Clotrimazol
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standard Institute</i>
CMEB	Concentração mínima de erradicação do biofilme
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
CSI	Concentração Sub-Inibitória
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EPM	Erro padrão médio
FLU	Fluconazol
G	Força da gravidade
gr	Grama
ICIF	Índices de Concentração Inibitória Fracionada

IC50	Concentração inibitória média
IK	Índice de retenção de Kovats.
LabMicro	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
logUFC/mL	Logaritmo de unidades formadoras de colônia por mililitro
M	Molar
MIC	Miconazol
mg	Miligrama
min	Minutos
mL	Mililitro.
NIS	Nistatina
nm	Nanômetros
OD	Densidade ótica
OE	Óleo essencial
OELaIII	Óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown
OELaIII-ANF	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e antifúngico
OELaIII-NIS	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Nistatina
OELaIII-CET	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Cetoconazol
OELaIII-MIC	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Miconazol
OELaIII-CLO	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Clotrimazol
OELaIII-CIC	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Ciclopirox-olamina
OELaIII-ANFO	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Anfotericina
OELaIII-FLU	Associação do óleo essencial das folhas do quimiotipo III (limonemo e carvona) de <i>Lippia alba</i> (Mill.) N. E. Brown e Fluconazol
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial de hidrogênio

SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
UFC	Universidade Federal do Ceará
μL	Microlitros

LISTA DE SÍMBOLOS

*	Asterisco
β	Beta
$\geq$	Maior e igual
$<$	Menor que
$>$	Maior que
μ	Mi
%	Por cento

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 REFERÊNCIAL TEÓRICO	23
2.1 O gênero <i>Candida</i>	23
2.2 Resistência fúngica	24
2.3 Óleos essenciais	26
2.4 A espécie <i>Lippia alba</i>	30
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	34
4.1 Objetivo Geral	34
4.2 Objetivos Específicos.....	34
5 MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1 Estratégia experimental	35
5.2 Obtenção do material botânico e identificação da espécie.....	35
5.3 Extração e análise do OELaIII.....	36
5.4 Cepas microbianas.....	36
5.5 Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes	36
5.6 Ensaios microbiológicos	37
5.6.1 Determinação da concentração Inibitória Mínima - CIM.....	37
5.6.2 Determinação da Concentração Letal Mínima - CLM	38
5.6.3 Determinação do efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana	39
5.6.4 Avaliação das cepas de <i>Candida</i> quanto à aderência e a formação de biofilme..	40
5.6.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Formação de Biofilme (CIMB)	41
5.6.6 Determinação da Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB) .	42
5.6.7 Determinação do efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos de uso clínico	43
5.6.8 Ensaios de mecanismo de ação	455

5.6.8.1 <i>Detecção de ocorrência de alteração na permeabilidade do envoltório celular</i>	45
5.6.8.1.1 Liberação de material genético	45
5.6.8.1.2 Liberação de proteínas	45
5.6.8.1.3 Ensaio do mecanismo do sorbitol	46
5.6.8.1.4 Ensaio do mecanismo do ergosterol	47
5.6.9 <i>Detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias de OELaIII na atividade fatores de virulência microbiana de cepas de Candida</i>	48
5.6.9.1 <i>Atividade da protease</i>	49
5.6.9.2 <i>Atividade da fosfolipase</i>	49
5.7 Atividade hemolítica do OELaIII	50
6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
7 RESULTADOS	52
7.1 Análise química do OELaIII	52
7.2 Ensaio microbiológicos	53
7.2.1 <i>Concentrações inibitória e letal mínimas do OELaIII e antifúngicos</i>	53
7.2.2 <i>Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana</i>	60
7.2.3	64
<i>Aderência e a formação de biofilme</i>	64
7.2.4 <i>Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme (CIMB)</i>	65
7.2.5 <i>Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB)</i>	68
7.2.6 <i>Efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos clínicos pelo método Checkerboard</i>	70
7.2.7 <i>Ensaio de mecanismo de ação</i>	80
7.2.7.1 <i>Ocorrência de alteração na permeabilidade do envoltório celular</i>	80
7.2.7.1.1 Liberação de material genético	80
7.2.7.1.2 Liberação de proteínas	84
7.2.7.1.3 Mecanismo de ação do sorbitol	88
7.2.7.1.4 Ensaio do mecanismo de ação do ergosterol	89
7.2.7.2 <i>Efeito de concentrações do OELaIII na atividade de fatores de virulência microbiana de cepas de Candida</i>	90
7.2.7.2.1 <i>Atividade proteinase</i>	90

7.2.7.2.2 Atividade fosfolipase.....	90
7.2.8 Atividade hemolítica do OELaIII.....	91
8 DISCUSSÃO	92
9 CONCLUSÃO.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101
ANEXOS	115

1 INTRODUÇÃO

A resistência aos antimicrobianos aumentou de forma exponencial nas últimas décadas, sendo considerada uma das maiores ameaças à saúde do século XXI. Estima-se que 700.000 pessoas morrem por ano em todo mundo, devido a infecções por cepas microbianas resistentes, e este número poderá aumentar para cerca de 10 milhões em 2050, caso não haja uma intervenção (O'NEILL, 2016).

No cenário atual, as opções de tratamento para infecções estão reduzidas e a pesquisa por novas moléculas com atividade antimicrobiana é uma necessidade urgente, entretanto, o número de patentes de novos compostos não está acompanhando o crescente aumento da resistência microbiana (LAXMINARAYAN *et al.*, 2013; BUTLER *et al.*, 2017).

As infecções fúngicas são, muitas vezes, consequência dos problemas de saúde frequentemente associados à imunossupressão. Apresentam alta mortalidade e sua resolução depende da resposta à terapia antifúngica. Infelizmente, as opções de tratamento são restritas, devido a limitada disponibilidade de classes de antimicóticos (BROWN *et al.*, 2012).

Devido aos casos de coinfeções que se apresentaram em pacientes acometidos pela Covid-19, a WHO divulgou uma lista com os patógenos fúngicos que são prioritários de modo a orientar o desenvolvimento de ações estratégicas de pesquisa e desenvolvimento voltados para a saúde pública, onde espécies de *Candida* sp. estão presentes nos grupos crítica, alta e média prioridade (MINA *et al.*, 2022).

As espécies de *Candida* são agentes oportunistas responsáveis por uma variedade de doenças, que vão desde infecções na pele e mucosas a infecções sistêmicas. *Candida albicans* é a espécie responsável por mais do que 70% de todas as infecções por *Candida*, no entanto, outras espécies começam a apresentar uma maior relevância clínica, como *C. parapsilosis* e *C. krusei* (DOMENICO *et al.*, 2018).

Os produtos vegetais são utilizados como medicamentos ao longo de toda a história humana e são a principal fonte para cuidados terapêuticos em cerca de 70% da população mundial, além disso, avanços nos estudos de produtos vegetais, possibilitam desenvolvimento tecnológico para a síntese e a produção de novos medicamentos a partir de compostos naturais, entre eles os óleos essenciais (BÔAS; DE KRUSE; GADELHA, 2007; AGUIAR *et al.*, 2008; DAVID *et al.*, 2015).

Considerando seu uso tradicional, os óleos essenciais são largamente estudados em relação a sua atividade antimicrobiana, sendo utilizados como alternativas aos medicamentos

atualmente empregados. Senso assim, é sugerido o uso de terapias combinadas que utilizam óleos essenciais para aumentar a atividade antibiótica como uma possível estratégia para combater a resistência microbiana (BUSH *et al.*, 2011)

Neste contexto, a erva-cideira, *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown., desponta como uma planta medicinal promissora e bastante utilizada na medicina popular do país, sob a forma de preparações como chás, macerada, em compressas e banhos. Os usos medicinais registrados, na literatura científica para a erva-cidreira são para o tratamento da ansiedade, espasmos, dores, como sedativa, para insônia e tosse (SETTE-DE-SOUZA *et al.*, 2014).

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 O gênero *Candida*

Este gênero compõe-se de cerca de 150-200 espécies, muitas das quais podem habitar o trato gastrointestinal, sistema urogenital, pele, e mucosa do trato respiratório de seres humanos (CANNON *et al.*, 2009).

Estão entre as principais causadoras de infecções invasivas com risco de vida nas últimas décadas, as leveduras do gênero *Candida*, apesar do tratamento, apresentam uma taxa de mortalidade próxima de 40%, sobretudo em condições hospitalares (BASMACIYAN *et al.*, 2019; CHEN *et al.*, 2020).

As espécies presentes neste gênero apresentam várias formas morfológicas, sendo os blastósporos responsáveis pela reprodução assexuada por brotamento (WALKER; WHITE, 2017). As cadeias de células de levedura alongadas caracterizam as pseudo-hifas, e as hifas são caracterizadas por cadeias ramificadas de células tubulares, sem estreitamento nos locais de septação (Figura 2) (KORNITZER, 2017).

A transição de um blastósporo para uma hifa é caracterizada pela ativação de uma complexa rede reguladora de vias de sinal, que inclui muitos fatores de transcrição. A principal diferença entre a composição de levedura e hifa é que a parede da hifa tem um teor ligeiramente maior de quitina do que a levedura (GARCÍA-RUBIO *et al.*, 2020).

A parede celular da *Candida* tem papel de proteger a célula de condições estressantes no ambiente, como alterações osmóticas, desidratação e mudanças de temperatura, e proteger as células da defesa imunológica do hospedeiro. Também é responsável pela adesão à célula hospedeira, com proteínas de adesão como Als1-7, Als9 e Hwp1 (HÖFS; MOGAVERO; HUBE, 2016; REYNA-BELTRÁN *et al.*, 2019; CIUREA *et al.*, 2020).

A comunicação da célula com o meio externo ocorre através da membrana celular. Os esteróis na membrana celular são extremamente importantes, dando à célula estabilidade, rigidez e resistência a estressores físicos. O ergosterol é o esterol mais representado e é característico da membrana celular dos fungos. É sintetizado no retículo endoplasmático e nos corpos lipídicos. Em seu metabolismo, a *Candida* utiliza glicose como fonte de carbono e aminoácidos como fontes de nitrogênio (CIUREA *et al.*, 2020; JORDÁ; PUIG, 2020).

Figura 1 – Formas morfológicas da *Candida albicans*



Fonte: <https://onlinesciencenotes.com/candida-albicans-morphology-pathogenesis-clinical-manifestations-diagnosis-treatment-prevention-and-control/>. Acessado em 15/10/2022.

2.2 Resistência fúngica

A resistência microbiana pode ser definida como a capacidade de uma cepa microbiana crescer, *in vitro*, na presença das concentrações que a droga atinge no sangue. Existem dois tipos de resistência associadas a microrganismos: a natural (faz parte das características genéticas primitivas dos microrganismos) e a adquirida (devido à pressão seletiva pelo uso de antimicrobianos, mutações ou por meio de transferências do material genético, pelos mecanismos de transdução, transformação e conjugação) (TAVARES, 1996; KONEMAN *et al.*, 2001; TORTORA *et al.*, 2004).

A resistência microbiana tem aumentado exponencialmente nas últimas décadas e é considerada como um dos maiores desafios de saúde do século atual. Estima-se que 700.000 indivíduos morrem todos os anos em todo o mundo devido a infecções causadas por cepas resistentes, e este número poderia aumentar para cerca de 10 milhões em todo o mundo até 2050, se não houvesse intervenção (O'NEILL, 2016).

Em determinadas situações, cepas de *Candida spp.* tornam-se agentes patogênicos e causam diversos tipos de infecções, que vão desde pequenas lesões localizadas, como a candidíase pseudomembranosa e estomatite (LYON *et al.*, 2006; GONSALVES *et al.*, 2007; LAM *et al.*, 2012); até candidíase sistêmica (LYON *et al.*, 2006; KEAN; RAMAGE, 2019).

A candidíase consiste em uma variedade de síndromes clínicas causadas por leveduras do gênero *Candida*, com aproximadamente 200 espécies presentes nos mais diversos nichos corporais (PEIXOTO *et al.*, 2014; XIA *et al.*, 2022). Essas infecções são relatadas desde o tempo de Hipócrates, que as descreveu como enfermidade associada a pacientes debilitados (SERRA CARBASSA & DOTTO, 2003).

Sabe-se que os medicamentos disponíveis no mercado, na maioria das vezes, apresentam limitações de uso, quer seja pelo baixo número de opções de antifúngicos ou pelas reações adversas causadas por uso prolongado, de uma forma ou outra, o uso indiscriminado leva ao aumento da resistência, o que pode determinar altas taxas de recidiva (ABILIO *et al.*, 2014). Frequentemente, as infecções fúngicas apresentam um tratamento difícil, o que pode estar relacionado à aquisição de resistência a agentes antifúngicos (DE ARAUJO *et al.*, 2004; SONG *et al.*, 2018).

Os mecanismos atribuídos a resistência para o gênero *Candida* estão associados principalmente a expressão aumentada da bomba de efluxo (resultando na baixa concentração do agente antifúngico no interior da célula fúngica), a maior expressão e modificação na estrutura de sítios alvos, além da formação de biofilme, esses mecanismos podem ocorrer isolados ou em conjunto, sendo que a expressão aumentada da bomba de efluxo de antifúngicos é a causa primária da resistência aos azóis em espécies de *Candida* (PERLIN; RAUTEMAA-RICHARDSON; ALASTRUEY-IZQUIERDO, 2017).

Para as espécies de *Candida* são relatadas duas grandes famílias de domínios proteicos transmembrana que funcionam como bombas de efluxo de fármacos (MFS - *Major Facilitator Superfamily*, ABC - *ATP-binding Cassete Transporters*), ambas utilizam diferentes fontes de energia para seu funcionamento efetivo no efluxo de moléculas do meio intracelular para o meio extracelular de espécies de *Candida* (CANNON *et al.*, 2009).

Outro importante mecanismo de resistência aos antifúngicos ocorre pela expressão aumentada do gene ERG11 que participa na regulação da síntese de ergosterol. O gene ERG11 codifica a enzima alvo dos antifúngicos azóis, a lanosterol 14 α -desmetilase, ao entrar em contato com o antifúngico, a depleção do ergosterol faz com que o microrganismo regule de forma positiva o gene ERG11, aumentando a presença de sítios alvo (HANI *et al.*, 2015).

A formação de biofilme pelas espécies de *Candida* spp. também é um importante mecanismo de resistência, pois biofilmes maduros apresentam uma estrutura bem consolidada, com substâncias denominadas de exopolissacarídeos (EPS - *extracellular polymeric substance*) constituindo uma matriz extracelular forte que promove a ligação das células a uma superfície. Para as espécies de *Candida* essa matriz é constituída por carboidratos, proteínas, hexosamina, fósforo e ácido urônico (KOO *et al.*, 2017). Os biofilmes podem ser constituídos por uma ou mais espécies de microrganismos envolvidos em uma matriz que é responsável por manter uma barreira mecânica estável capaz de proteger os microrganismos dos antifúngicos (KORDALEWSKA *et al.*, 2018).

O aumento no número de infecções fúngicas, especialmente em pacientes imunocomprometidos ou em tratamento por grandes períodos com antibióticos, levou a busca por novos agentes antifúngicos (AHMAD *et al.*, 2011), e as drogas terapêuticas para infecções por *Candida* são limitadas a cinco classes de compostos: polienos, alilaminas, azoles, fluoropirimidinas e equinocandinas (RABES *et al.*, 2015).

O pequeno número e a limitação dos antifúngicos sintéticos levam a busca por novas classes de medicamentos antifúngicos, utilizando como base, potentes moléculas bioativas de origem natural, com elevada eficácia terapêutica e diminuta toxicidade (SAINI *et al.*, 2008; RAJESHKUMAR & SUNDARARAMAN, 2012; GAVANJI *et al.*, 2015; MUSTHAFA *et al.*, 2016; BOZOVIC *et al.*, 2017).

Desta forma, conhecer os mecanismos de resistência antifúngica pode fornecer ideias sobre como limitar o surgimento de cepas resistentes e como desenvolver moléculas bioativas mais seguras e eficazes (ANIBAL *et al.*, 2010).

No entanto, a busca por novos compostos bioativos é um enorme desafio, devido às dificuldades para o desenvolvimento de novos antifúngicos, já que são necessários muitos anos e elevados custos para que um novo medicamento esteja disponível para o uso clínico.

2.3 Óleos essenciais

A definição internacional de OE é produto obtido por hidrodestilação, destilação a vapor ou destilação a seco ou por um processo mecânico adequado sem aquecimento (para frutas cítricas) de uma planta ou parte dela (RUBIOLO *et al.*, 2010). São líquidos oleosos aromáticos extraídos de material vegetal (LAIRD & PHILLIPS, 2012).

As plantas sintetizam OEs para uma variedade de propósitos, incluindo: proteção da planta contra fungos e bactérias, atividade alelopática, defesa contra insetos e atração de polinizadores (RAYBAUDI-MASSILIA *et al.*, 2009).

Os OE são originados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, destacando-se principalmente a presença de terpenos e fenilpropanóides (GONÇALVES *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2003). São produzidos por mais de 17.500 espécies de plantas aromáticas pertencentes a muitas famílias, por exemplo, Lamiaceae, Rutaceae, Myrtaceae, Zingiberaceae (REGNAULT-ROGER *et al.*, 2012).

São raramente encontrados em gimnospermas, no entanto, são abundantes em angiospermas dicotiledôneas (SIMÕES *et al.*, 2016). Seu armazenamento e secreção dependem

da família de plantas, que apresentam estruturas especializadas, tais como pêlos glandulares (*Lamiaceae*), células parenquimáticas diferenciadas (*Lauraceae*, *Piperaceae*, *Poaceae*), canais oleíferos (*Apiaceae*), bolsas lisígenas e esquizolisígenas (*Pinaceae*, *Rutaceae*) (MARQUES *et al.*, 2008).

Quanto aos métodos de extração dos OEs, estes variam conforme sua localização na planta e principalmente com a utilização do mesmo após a extração. Os métodos mais comuns são:

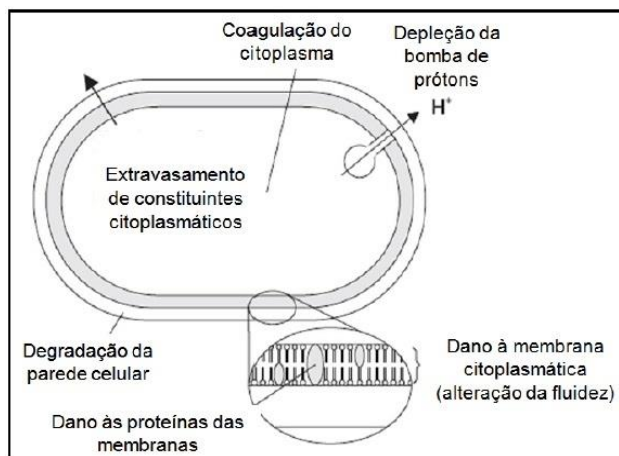
- “Enfleurage”: empregado para extrair óleos essenciais de pétalas de flores. As pétalas são depositadas sobre uma camada de gordura e ficam em contato durante certo período. Em seguida essas pétalas são substituídas por novas até a saturação total da gordura que é tratada com álcool. Para se obter o óleo essencial, a mistura de gordura e álcool é destilada a baixa temperatura.
- Arraste por vapor d’água: os constituintes do material vegetal que possuem pressão de vapor mais elevada que a água, são arrastados pelo vapor d’água. Em pequena escala, emprega-se o aparelho de Clevenger. O óleo essencial obtido, após separar-se da água, deve ser seco com Na_2SO_4 anidro. Esse método é geralmente utilizado para extrair óleos de plantas frescas.
- Extração com solventes orgânicos: os óleos essenciais são extraídos com solventes apolares.
- Prensagem: é empregado para extração de óleos essenciais de frutos cítricos. Os pericarpos são prensados e a camada que contém o óleo essencial é, então, separada. Posteriormente, o óleo é separado da emulsão formada com água através de decantação, centrifugação ou destilação fracionada.
- Extração por CO_2 super crítico: o CO_2 é primeiramente liquefeito através de compressão e, em seguida, aquecido a uma temperatura superior a $31\text{ }^\circ\text{C}$. Nessa temperatura, o CO_2 atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga à de um gás, mas sua capacidade de dissolução é elevada como a de um líquido. Uma vez efetuada a extração, faz-se o CO_2 retornar ao estado gasoso, resultando na sua eliminação (SIMÕES *et al.*, 2016).

Devido a sua composição complexa, os OEs apresentam uma variedade de ações biológicas, tornando-os potenciais fontes para o desenvolvimento de novos medicamentos (AMARAL, 2004).

Diversos estudos farmacológicos comprovam as ações dos OEs: podem estimular, deprimir ou causar convulsões através da ação no Sistema Nervoso Central; podem possuir atividade anestésica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, podendo também atuar em nível de sistema digestivo, respiratório, cardiovascular, neurológico e doenças de pele (GIRÓN *et al.*, 1991; FRANCO & BARROS, 2006; RODRIGUES & GUEDES, 2006; TOSCANO-GONZALEZ, 2006; TEXEIRA, 2009; FRATERNALE *et al.*, 2013; WEI & WEE, 2013; HELDWEIN *et al.*, 2012; HATANO *et al.*, 2012; DE RAPPER *et al.*, 2016; JARADAT *et al.*, 2016; JARADAT *et al.*, 2017; COSTA *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018; HUANG *et al.*, 2021).

Por agirem em múltiplos alvos, os OEs são capazes de impedir o desenvolvimento de resistência em microrganismos (Figura 2) (LEITE DE SOUZA, 2016), o que leva ao interesse de sua aplicação em cosméticos e produtos farmacêuticos, bem como aromatizantes e conservantes para alimentos (HYLDGAARD *et al.*, 2012).

Figura 2 – Mecanismos propostos para a ação antimicrobiana dos óleos essenciais



Fonte: Wagner & Ulrich-Merzenich (2009).

O mecanismo de ação dos OEs e seus componentes sobre bactérias pode ser atribuído à ruptura do envoltório microbiano. Técnicas microscópicas mostram danos ao envoltório celular causados pelos OE: perda da integridade e permeabilidade, rugosidade, distorção, alongamento celular, separação da membrana celular das paredes celulares, lise e vazamento de conteúdo citoplasmático (SHEN *et al.*, 2015).

Entretanto, outros mecanismos também estão associados a ação dos OEs, como a perda de íons (PATRA & BAEK, 2016), inibição enzimática (DI PASQUA *et al.*, 2010) e perda da expressão proteica (KOVAC *et al.*, 2015).

Em relação a atividade antifúngica, o conhecimento sobre o mecanismo dos OEs é

limitado, devido principalmente, a escassez de estudos que busquem entender os mecanismos moleculares da ação dessas substâncias. (VERMA *et al.*, 2011). Análises químicas dos constituintes dos óleos essenciais mostram que seus compostos bioativos são fenóis, terpenos, aldeídos e cetonas, e estas substâncias atuam em membranas citoplasmáticas e na parede celular, perturbando suas estruturas e elevando sua permeabilidade (LV *et al.*, 2011).

Considerando que o mecanismo de ação dos OEs não é completamente compreendido, entender o mecanismo das interações OE-antifúngicos é ainda mais complexo, devido sua ação em vários alvos, determinada pelos seus muitos componentes (WAGNER & ULRICH-MERZENICH, 2009).

Desta forma, com o aumento da resistência microbiana a múltiplas drogas, tais como antifúngicos, o uso de combinações sinérgicas entre moléculas naturais e fármacos comerciais pode ser uma boa alternativa para o controle de microrganismos resistentes, reduzindo as doses e consequentemente os efeitos adversos associados ao tratamento (DODOU *et al.*, 2017).

Em combinação com outros compostos, os óleos essenciais podem produzir efeitos sinérgicos (um efeito maior em combinação que a soma dos efeitos das substâncias isoladas), aditivos (efeito da combinação é igual ao simples somatório do efeito das substâncias isoladas) ou antagônicos (a combinação leva a uma diminuição do efeito das duas substâncias) (EFFERTH & KOCH, 2011). Desta forma, as associações sinérgicas levariam a um aumento da eficácia (RHATHER *et al.*, 2013), na redução de doses e de efeitos adversos (CASETTI *et al.*, 2012; BAG *et al.*, 2015; ZHANG; YAO, 2019).

Assim, a ação de óleos essenciais sobre alvos não específicos, como a membrana ou a parede celular, levaria ao aumento da entrada de um agente antimicrobiano em combinação, elevando assim sua concentração no local de ação específico, resultando em efeito sinérgico, mediado pelo aumento da permeabilização do envoltório celular (LANGEVELD *et al.*, 2014).

Portanto, as pesquisas sobre a atividade antifúngica de produtos naturais, como os OEs são de grande interesse e importância para a medicina, o que pode ser explicado pelo crescente aumento da resistência de patógenos associados a doenças infecciosas aos antifúngicos disponíveis (REICHLING *et al.*, 2009).

Dessa forma, os OEs assumem importante papel na prevenção ao desenvolvimento de resistência microbiana, que vem sendo motivo de preocupação constante no tratamento das doenças infecciosas.

2.4 A espécie *Lippia alba*

O Brasil tem uma das florestas mais diversificadas no mundo, que se espalha por seis biomas fitogeográfico: a Amazônia, Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, alguns dos quais são reconhecidos como pontos de acesso globais de biodiversidade (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2018). Estima-se que, embora sejam conhecidas estruturas de 200 mil produtos naturais, apenas 15% das 350 mil espécies de plantas foram investigadas (WURTZELE & KUTCHAN, 2016).

A família Verbenaceae apresenta distribuição tropical e subtropical, sendo composta por cerca de 90 gêneros, incluindo o gênero *Lippia*, com mais de 200 espécies de plantas (PASCUAL, 2001).

A *Lippia alba* (Verbenaceae) (Figura 1), popularmente conhecida como erva-cidreira, é amplamente utilizada pela população devido seus efeitos tranqüilizante, antiespasmódico, analgésico, sedativo, ansiolítico, expectorante, anti-inflamatória, antipirética, para o tratamento de doenças cutâneas, problemas gastrointestinais, doenças hepáticas, cólicas menstruais e algumas infecções sexualmente transmissíveis (sífilis e gonorreia) (PASCUAL *et al.*, 2001; SETTE-DE-SOUZA *et al.*, 2014). É utilizada em forma de chás, macerada, em compressas, banhos ou extratos alcoólicos, por causa de suas propriedades farmacológicas, devidas aos seus constituintes ativos, dentre eles o óleo essencial (JULIÃO *et al.*, 2003).

Figura 3 – *Lippia alba* (MILL.) N. E. Brown



Fonte: O autor (2022).

Possui diversos nomes populares como chá-de-tabuleiro, cidrila, erva-cidreira-de-arbusto, alecrim-selvagem, cidreira-brava, falsa melissa, erva-cidreira, erva-cidreira-brasileira,

erva-cidreira-do-campo, cidreira carmelitana, salva, salva-do-brasil, salva-limão, alecrim-do-campo, salva-brava e sálvia (TAVARES *et al.*, 2005).

Os quimiotipos de *L. alba* são caracterizadas pela variabilidade na composição química de seus OEs, e devido a isto, seu aroma está relacionado aos constituintes majoritários, os quais podem variar, em função de diversos fatores: como a estações do ano, época de floração, idade da planta, quantidade de água circulante, parte da planta utilizada na destilação, localização geográfica, características do solo, do clima, e outras condições locais (STASHENKO *et al.*, 2004; AGUIAR *et al.*, 2008).

De acordo com os constituintes químicos majoritários presentes no óleo essencial, a *L. alba* pode ser classificada em quimiotipos, tais como o quimiotipo carvona-citral (HENNEBELLE *et al.*, 2006; JANNUZZI *et al.*, 2010).

A composição do óleo essencial varia muito, sugerindo a existência de um elevado número de quimiotipos. De acordo com Hennebelle *et al.* (2008), há pelo menos sete quimiotipos com base na composição e possível vias biossintéticas comuns entre diferentes óleos: quimiotipo I (citral, linalol e cariofileno), quimiotipo II (tagetenona), quimiotipo III (limoneno e carvona), quimiotipo IV (mirceno), quimiotipo V (terpineno), quimiotipo VI (cânfora e 1,8-cineol) e quimiotipo VII (estragol).

Matos *et al.* (1996), classificou a *L. alba* do nordeste do Brasil em três diferentes quimiotipos e denominou de acordo com os constituintes majoritários: quimiotipo I (citral, b-mirceno e limoneno), quimiotipo II (citral e limoneno) e quimiotipo III (carvona e limoneno).

Diversos estudos científicos comprovam as atividades ansiolítica, antioxidante, anestésica, antienotóxica, antivirais, antibacterianas, antifúngicas e antiparasitárias do OE de *L. alba*, justificando assim seu uso popular (AGUIAR, 2008; ESCOBAR *et al.*, 2010; LOPEZ *et al.*, 2011; HATANO *et al.*, 2012; HELDWEIN *et al.*, 2012; CHIES *et al.*, 2013; OLIVERO-VERBEL *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2016; PORFIRIO *et al.*, 2017; SILVA *et al.*, 2018).

Diante do exposto, o presente trabalho se propõe a investigar a atividade antifúngica do OE de *L. alba*, seu mecanismo de ação, seu efeito modulador na atividade de antifúngicos de uso clínico e sua ação sobre a atividade de fatores de virulência de *Candida*. E dessa forma, identificar uma nova alternativa terapêutica, fornecendo dados para o desenvolvimento de um novo fármaco.

3 JUSTIFICATIVA

Compostos vegetais farmacologicamente ativos extraídos de cascas, folhas, raízes e frutos veem sendo estudados há décadas para a obtenção de novas moléculas para os mais diversos fins terapêuticos. Muitas vezes os estudos de atividade biológica são direcionados pela medicina popular tradicional e muitos deles contribuem para a constatação científica das propriedades biológicas exploradas no uso popular de diversos óleos essenciais e extratos vegetais.

Dessa forma, a busca por matérias-primas vegetais encoraja os pesquisadores a continuar estudando os aspectos farmacológicos e toxicológicos desses produtos, para servir de suporte ao seu possível uso terapêutico, além de fornecer insumos para a produção de novos medicamentos.

Estudos botânicos, químicos e farmacológicos vêm sendo realizados e cada vez mais demonstram e justificam a importância e o potencial da flora brasileira. Entre eles se destacam os estudos fitoquímicos de pesquisa de atividade antimicrobiana de plantas medicinais. Esses estudos muitas vezes culminam em moléculas com atividade que posteriormente podem servir de protótipo para elaboração de um fármaco (CALIXTO & YUNES 2001; LEVY & MARSHALL; 2004).

O desenvolvimento de resistência a antifúngicos, por cepas de *Candida*, vem fazendo com que este gênero seja alvo cada vez mais frequente de pesquisas de novos compostos com atividade antimicrobiana (AHMAD *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2012).

Assim, novas moléculas capazes de inibir infecções por *Candida*, ou melhorar a ação dos antifúngicos clínicos, pode ser algo promissor na luta contra a resistência fúngica e na redução das barreiras do tratamento convencional, como os efeitos adversos e a toxicidade (ZUZARTE *et al.*, 2012).

O OE de *L. alba* apresenta um amplo espectro de atividade antimicrobiana, sendo capaz de inibir o crescimento de cepas bacterianas Gram-negativo e Gram-positivo, com potência que varia de acordo com a sua composição (MACHADO *et al.*, 2014).

Em vista disso, a necessidade de estudos na área de pesquisa de novos antifúngicos, este projeto se propõe investigar a atividade antifúngica do óleo essencial do quimiotipo III de *Lippia alba* (OELaIII), seu mecanismo de ação, seu efeito modulador na atividade de antifúngicos de uso clínico e sua ação sobre a atividade de fatores de virulência, esclarecendo

cientificamente seu uso popular e fornecendo subsídios para o desenvolvimento de um novo fármaco.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do óleo essencial do quimiotipo III de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown.

4.2 Objetivos Específicos

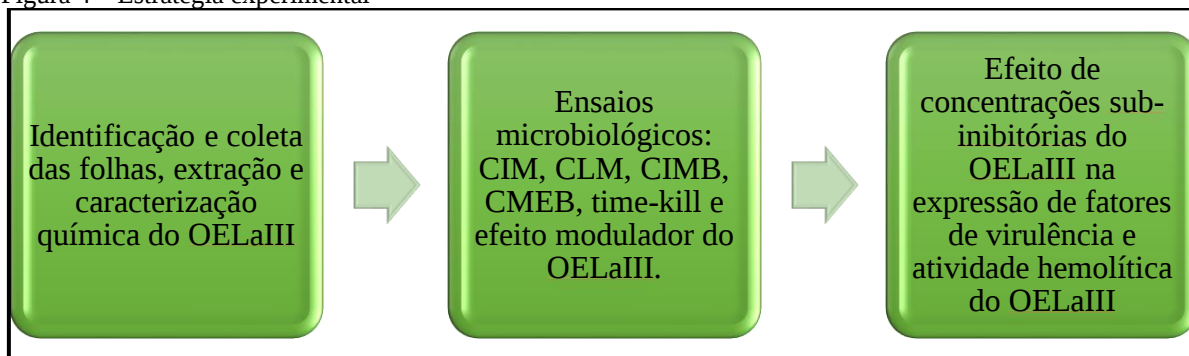
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaIII sobre cepas de *Candida*;
- Avaliar o efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana de cepas de *Candida*;
- Avaliar o efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos de uso clínico;
- Avaliar o efeito de concentrações do OELaIII na atividade de fatores de virulência de cepas de *Candida* (biofilme, proteinase e fosfolipase).
- Avaliar o efeito citotóxico do OELaIII sobre hemácias.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Estratégia experimental

Este projeto foi executado em três etapas: na primeira etapa foi realizada a identificação e coleta das folhas, seguida da extração e caracterização química do OELaIII. Na segunda etapa, foram realizados os ensaios microbiológicos, determinando as concentrações inibitórias e letais mínimas do OELaIII para as células planctônicas das cepas de *Candida*; as concentrações inibitórias mínimas de formação e erradicação dos biofilmes do OELaIII para os biofilmes de *Candida*; o efeito do tempo de exposição do OELaIII na viabilidade das cepas de *Candida* e a atividade moduladora do OELaIII sobre a atividade de antifúngicos clínicos. Na terceira etapa foram investigados o mecanismo de ação do OELaIII; o efeito de concentrações sub-inibitórias do OELaIII na expressão de fatores de virulência das cepas de *Candida* e atividade hemolítica do OELaIII (Figura 4).

Figura 4 – Estratégia experimental



Fonte: O autor (2022).

5.2 Obtenção do material botânico e identificação da espécie

As amostras das folhas do quimiotipo III de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown foram coletadas no mês de novembro (2018) no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará (-3.74578127S, -38.57743103W). A exsicata da espécie foi depositada no Herbário Prisco Bezerra, Departamento de Biologia, UFC, sob o número 59675. A atividade de acesso ao Patrimônio Genético foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), com número de cadastro A0F234C, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

5.3 Extração e análise do OELaIII

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação (arraste de vapor), das folhas frescas do quimiotipo III de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. As amostras foram colocadas em um mariote ligado a uma fonte de vapor, sendo o mesmo acoplado a um extrator tipo Clevenger e um condensador (CRAVEIRO, 1981). Após duas horas de extração, foram separadas as fases óleo/água no doseador. A fase orgânica foi ser tratada com sulfato de sódio anidro e filtrada. O estudo da composição química do OELaIII foi realizado por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), em aparelho do tipo Shimadzu modelo GC/MS QP 5050A. Os componentes do OELaIII foram identificados através da comparação de seus espectros de massa com espectros existentes na literatura (ADAMS 2017), com espectros do bando de dados (NIS21 e NIS107) do equipamento e, também, pela comparação dos índices de retenção da literatura. Os índices de retenção de Kovats (IK) foram determinados utilizando uma série homóloga de n-alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras, utilizando a equação de Van den Dool e Kratz (VAN DEN DOOL & DE KRAATZ, 1963).

5.4 Cepas microbianas

Foram utilizadas oito cepas microbianas de referência provenientes da American Type Culture Collection (ATCC): *C. albicans* ATCC 64124, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 90029, *C. albicans* ATCC 44858, *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* ATCC 90018. Todas as cepas utilizadas fazem parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia Aplicada (LabMicro) e foram mantidas em ágar estoque sob refrigeração, de forma a conservarem inalterados todas as suas características bioquímicas e perfil de sensibilidade a antimicrobianos. Periodicamente foram realizados repiques para meios de cultura estéreis e a pureza de cada cultura foi confirmada por microscopia, provas bioquímicas e antibiogramas.

5.5 Antimicrobianos, meios de cultura e reagentes

Os antimicrobianos e reagentes foram obtidos da Sigma Chemical Co. (St Louis, MO, USA). Os meios de cultura foram obtidos da HIMEDIA (Mumbai, Maharashtra, Índia).

5.6 Ensaios microbiológicos

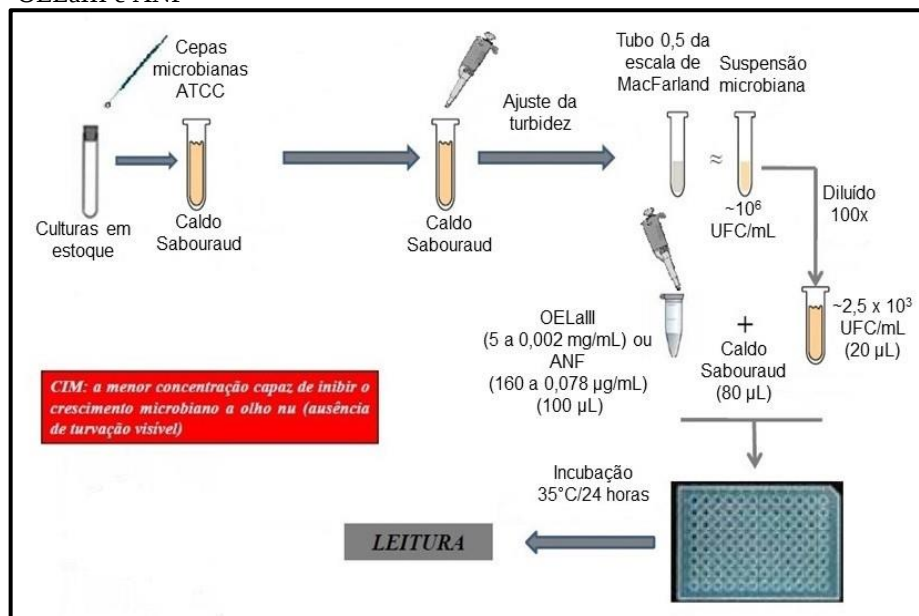
Todos os ensaios microbiológicos foram realizados em triplicata, em três repetições, no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LabMicro-DACT-UFC).

5.6.1 *Determinação da concentração Inibitória Mínima - CIM*

Os valores de CIM do OELaIII e dos antifúngicos (ANF) foram determinados pelo método de microdiluição em caldo de cultura, de acordo com a metodologia descrita pelo CLSI (2008), com algumas modificações. Culturas microbianas puras mantidas em ágar Sabouraud Dextrose (ASD) sob refrigeração foram repicadas em caldo Sabouraud Dextrose (CSD) e incubadas a 35°C até atingirem fase exponencial de crescimento. Após esse período, as culturas tiveram sua densidade celular ajustada em solução salina 0,85% estéril para se obter uma turbidez comparável à do tubo 0,5 da escala de McFarland, o que resultou em uma suspensão microbiana contendo aproximadamente $1,5 \times 10^6$ UFC/mL. Em seguida a suspensão foi diluída 100 vezes em CSD. Aos poços da microplaca (Kasvi) foram adicionados 100 µL de CSD, 20 µL do OELaIII (5 a 0,002 mg/mL) ou ANF (160 a 0,078 µg/mL) e 80 µL da suspensão microbiana (concentração final de aproximadamente $2,5 \times 10^3$ UFC/mL). Aos poços-controle de inibição do crescimento microbiano, foram adicionados o meio de cultura, o agente antifúngico e o inóculo do microrganismo. Aos poços-controle de não inibição do crescimento microbiano, foram adicionados o meio de cultura, o diluente do OELaIII (Tween 80 a 1%) ou do ANF (DMSO a 1%), e inóculo do microrganismo.

As microplacas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Passado esse tempo, foram submetidas à inspeção visual de crescimento microbiano e à leitura de absorbância a 620 nm, em leitor de Elisa (BioTek). A CIM foi considerada a menor concentração do OELaIII ou ANF, capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, comprovada pela ausência de turvação visível. As leituras de absorbância foram utilizadas para evitar erros determinados pela turvação do OELaIII (Figura 3).

Figura 5 – Fluxograma da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do OELaIII e ANF



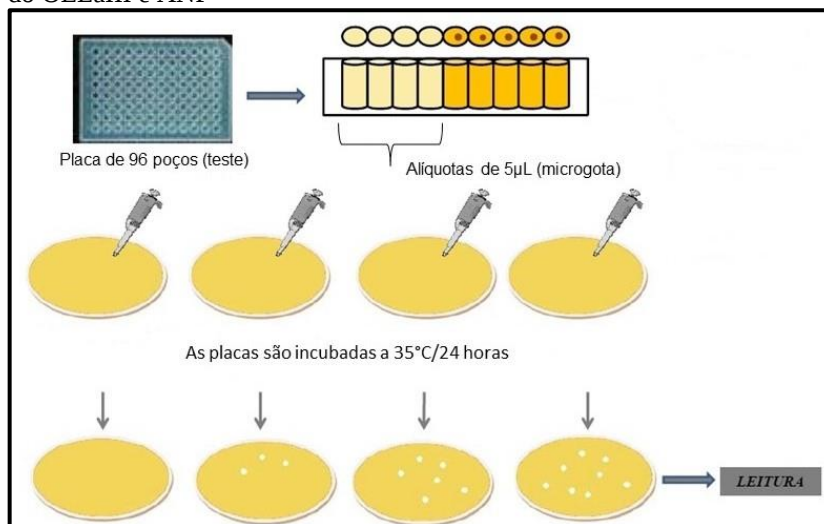
Fonte: O autor (2022).

5.6.2 Determinação da Concentração Letal Mínima - CLM

De forma asséptica, foram depositados inóculos de 5 µL obtidos a partir dos poços das microplacas usadas para a determinação da CIM que não apresentaram crescimento microbiano visível, na superfície do ágar Plate-Count (APC). As placas foram incubadas a 35°C e após 24h foram feitas as contagens das colônias crescidas na superfície do ágar. A concentração do óleo essencial que determinou um crescimento microbiano na superfície do ágar < 0,1% do inoculo inicial, foi considerada a CLM, ou seja, a menor concentração capaz de determinar a morte de 99,9% das células microbianas (CASTRO, 2010).

O tamanho do inoculo microbiano inicial foi determinado pela técnica de microgotas (ROMEIRO, 2007), para confirmar se as suspensões microbianas usadas continham realmente o crescimento microbiano desejado, ou seja, aproximadamente $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Para isso, foram adicionadas, assepticamente, 5 gotas contendo cada uma 5 µL de uma suspensão microbiana inicial, sobre superfície do APC, que foi incubado a 35°C por 24h. Após esse período, as colônias crescidas na superfície do ágar foram contadas, e calculada a média aritmética e o valor obtido multiplicado pelo valor da diluição. Os resultados foram expressos como a média dos valores obtidos (Figura 4).

Figura 6 – Fluxograma da determinação da Concentração Letal Mínima (CLM) do OELaIII e ANF

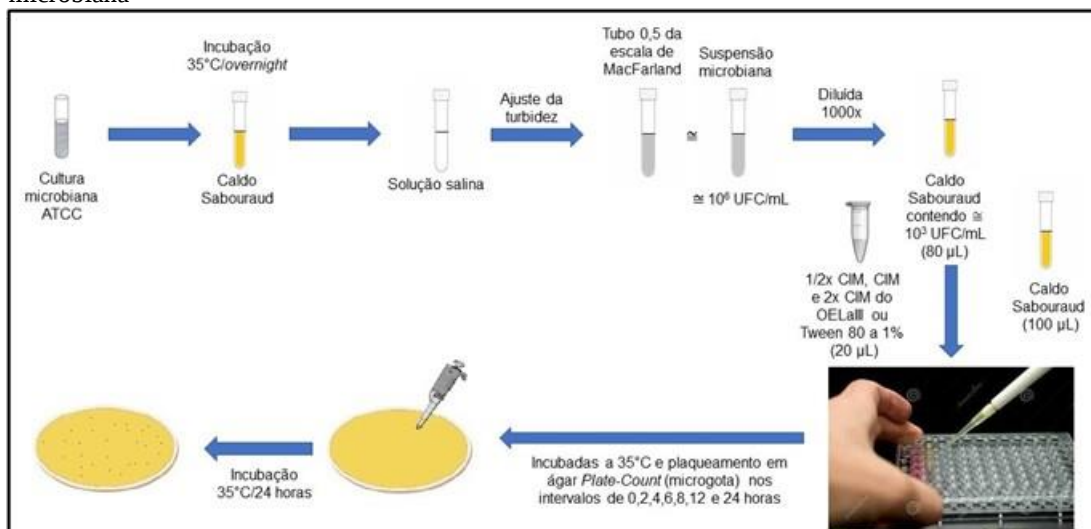


Fonte: O autor (2022).

5.6.3 Determinação do efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana

Para determinar o efeito do tempo de exposição ao OELaIII sobre a viabilidade celular de cepas de referência de *Candida*, foi seguida a metodologia descrita por Matasyoh et al. (2007), com algumas modificações. Alíquotas de 20 µL de OELaIII, em concentrações iguais 1/2x CIM, CIM e 2x CIM foram adicionadas aos poços da microplaca contendo 100 µL de CSD e 80 µL de suspensão microbiana ($2,5 \times 10^3$ UFC/mL). As microplacas foram incubadas a 35 °C e após intervalos de tempo predeterminados (0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 e 24 horas), alíquotas de 5 µL foram semeadas em APC pela técnica da microgota (ROMEIRO, 2008). A contagem das colônias foi realizada após 24 horas de incubação a 35 °C, Tween 80 a 1% e Miconazol µg/L foram utilizados como controles e os resultados foram expressos em logaritmo (log) de UFC/mL (Figura 5).

Figura 7 – Fluxograma da determinação do efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana



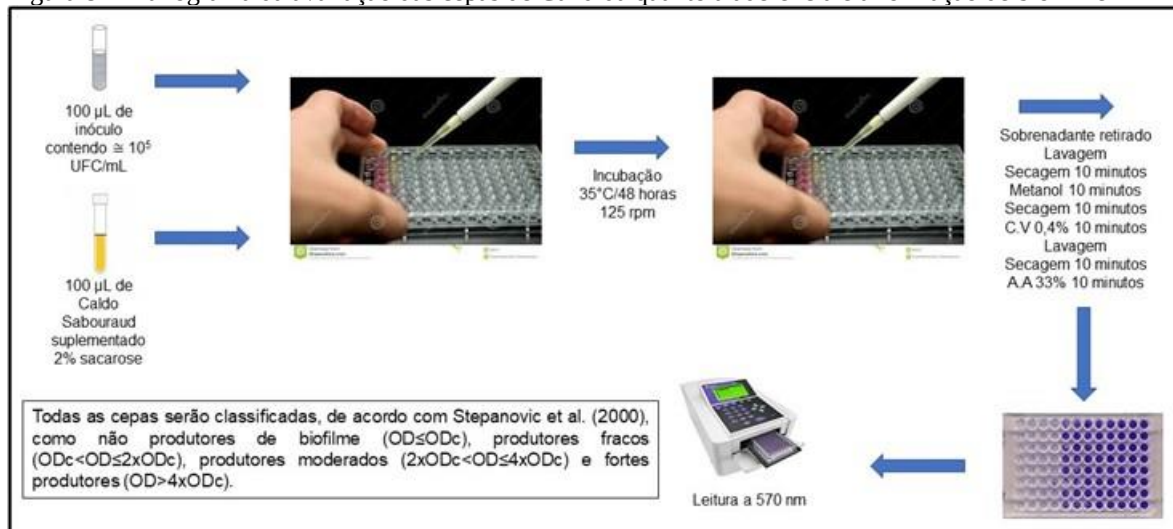
Fonte: O autor (2022).

5.6.4 Avaliação das cepas de *Candida* quanto à aderência e a formação de biofilme

A fim de avaliar a aderência do biofilme de *Candida*, 100 µL de CSD foram adicionados em cada poço da microplaca, seguido da adição de 100 µL do inoculo ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) preparado com CSD suplementado com sacarose a 2%. O grupo controle utilizado neste teste foi o CSD. As microplacas foram incubadas em agitador (125 rpm) a 35°C durante 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e as microplacas lavadas com água destilada estéril para retirar as células não aderidas. Após, as microplacas foram secas em temperatura ambiente (10 min), seguida de uma etapa de fixação das células com 200 µL de metanol (10 min), descarte do fixador e secagem (10 min). Em seguida, 200 µL de uma solução de cristal violeta 0,4% foram adicionados a cada poço e a microplaca foi incubada (10 min). Posteriormente, os poços foram lavados com água destilada estéril, para remover o excesso de cristal violeta, seguido de secagem (10 min). As microplacas então foram descoradas com adição de 200 µL de uma solução de ácido acético 33%, por 10 minutos. Na última etapa, os 200 µL da solução descorante de ácido acético foram transferidos para outra microplaca de 96 poços de fundo chato e realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas de Elisa, na faixa de absorbância de 570 nm. Para normalização dos resultados, os valores da absorbância dos controles negativos foram subtraídos das amostras teste (adaptado de FREIRES *et al.*, 2014). O valor de ponto de corte (ODc) para o ensaio de formação do biofilme foram definidos como a média de OD 570 nm do controle negativo (Figura 6). Todas as cepas foram classificadas, de acordo com Stepanovic *et al.* (2000), como não produtores de biofilme

($OD \leq OD_c$), produtores fracos ($OD_c < OD \leq 2 \times OD_c$), produtores moderados ($2 \times OD_c < OD \leq 4 \times OD_c$) e fortes produtores ($OD > 4 \times OD_c$).

Figura 8 – Fluxograma da avaliação das cepas de *Candida* quanto à aderência e a formação de biofilme



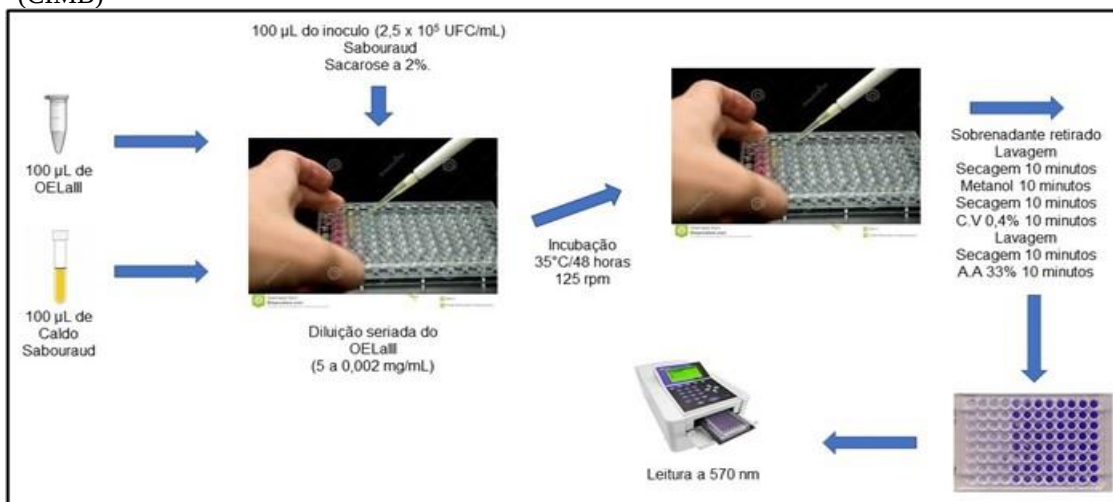
Fonte: O autor (2022).

5.6.5 Determinação da Concentração Inibitória Mínima de Formação de Biofilme (CIMB)

Esse ensaio foi realizado para determinar qual a menor concentração de OELaIII capaz de inibir a formação de biofilme pelas cepas testadas. A fim de avaliar a formação do biofilme de *Candida*, 100 µL de CSD foram adicionados em cada poço, seguido da adição de 100 µL OELaIII na primeira fileira de poços, onde o mesmo foi serialmente diluído no próprio meio, com uma relação de 1/2 para obter as concentrações de trabalho (5 a 0,002 mg/mL). Em seguida, foram adicionados nos poços 100 µL do inóculo ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) preparado com meio CSD suplementado com sacarose a 2%. Os grupos controles utilizados neste teste foram: o meio de cultura, o crescimento de leveduras (também usado como padrão de formação para as comparações), Miconazol 20 µg/mL (controle da inibição do crescimento) e Tween 80 a 1% (controle da não inibição do crescimento). As microplacas foram incubadas sob agitação orbital (125 rpm) a 35°C durante 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e as microplacas lavadas com água destilada estéril para retirar as células não aderidas. Após, as microplacas foram secas em temperatura ambiente (10 min), seguida de uma etapa de fixação das células com 200 µL de metanol (10 min), descarte do fixador e secagem (10 min). Em seguida, 200 µL de uma solução de cristal violeta 0,4% foram adicionados a cada poço e a microplaca foi incubada (10 min). Posteriormente, os poços foram lavados com água destilada estéril, para remover o excesso de cristal violeta, seguido de secagem (10 min). As microplacas

então foram descoradas com adição de 200 μL de uma solução de ácido acético 33%, por 10 minutos. Na última etapa, os 200 μL da solução descorante de ácido acético foram transferidos para outra microplaca de 96 poços de fundo chato e realizada a leitura da absorbância em leitor de microplacas de Elisa, na faixa de absorbância de 570 nm (Figura 7). A CIMB foi considerada a menor concentração capaz de inibir a formação do biofilme (adaptado de FREIRES *et al*, 2014).

Figura 9 – Fluxograma da determinação da Concentração Inibitória Mínima de Formação de Biofilme (CIMB)



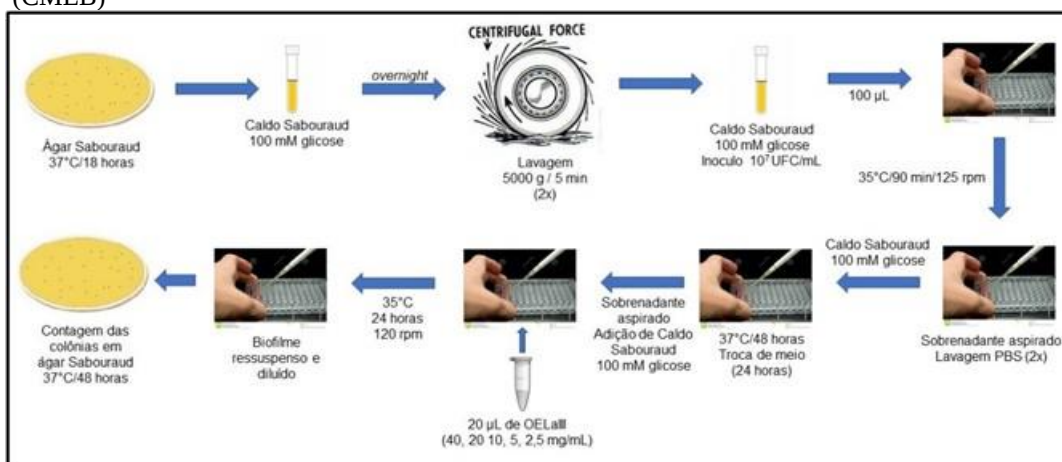
Fonte: O autor (2022).

5.6.6 Determinação da Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB)

Esse ensaio foi realizado para determinar qual a menor concentração de OELaIII capaz de erradicar o biofilme já formado. Cepas de referência de *Candida* foram cultivadas a 37°C por 18 horas em ASD. Em seguida, uma fração do inóculo microbiano foi transferido para CSD suplementado com 100 mM de glicose e incubado *overnight*. As culturas foram centrifugadas a 5000g por 5 minutos e as células lavadas duas vezes com 5 mL de solução fisiológica tampão fosfato (PBS) estéril. Após uma nova centrifugação, as células foram coletadas e ressuspensas em CSD suplementado com 100 mM de glicose. A suspensão foi padronizada em aproximadamente 10^7 UFC/mL. Para formação do biofilme, 100 μL da suspensão do microrganismo foram adicionados aos poços da microplaca, e a mesma foi incubada sob agitação (75 rpm) a 35°C por 90 min para fase inicial de adesão. Decorrido este período, o caldo foi gentilmente aspirado e cada poço lavado duas vezes com 200 μL de PBS estéril, para a remoção das células não aderidas. Em seguida foram adicionados 200 μL de CSD suplementado com 100 mM de glicose e as microplacas incubadas a 37°C por 48 horas sob

agitação, sendo o meio de cultura trocado após 24 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante de cada poço da microplaca com os biofilmes formados foi aspirado. Para a remoção das células não aderidas ao biofilme, foram adicionados 200 μL de PBS estéril as microplacas, e mantida a agitação por 5 minutos. Após a retirada do PBS foram adicionados 20 μL do OELaIII em diferentes concentrações (40, 20, 10, 5 e 2,5 mg/mL), juntamente com 180 μL de CSD suplementado com 100 mM de glicose, aos biofilmes formados no fundo da microplaca, sendo a mesma incubada por 24 horas a 35°C sob agitação orbital (120 rpm). Para os controles foram utilizados uma solução fisiológica de PBS estéril e uma solução de Miconazol 20 $\mu\text{g/mL}$. Após o período de 24 horas, da aplicação do OELaIII, o fundo dos poços da microplaca foi cuidadosamente raspado com o auxílio de uma micropipeta estéril. A seguir, 200 μL do conteúdo resultante de cada poço foi aspirado e transferido para um eppendorf contendo 1800 μL de PBS estéril, o conteúdo dos eppendorfs foi homogeneizados por 30 segundos para desprender as células do biofilme. O biofilme desprendido, ressuspensão em PBS, foi considerado como fator de diluição 10^{-1} . Aliquotas de 5 μL de cada diluição seriadas foram semeadas em placas de ASD e incubadas a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação foi feita a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC/mL) e os valores obtidos foram transformados em logaritmo (log) de UFC/mL (Figura 8). A CMEB foi considerada a menor concentração de OELaIII capaz de erradicar o biofilme já formado (RASTEIRO, 2011).

Figura 10 – Fluxograma da determinação da Concentração Mínima de Erradicação de Biofilme (CMEB)



Fonte: O autor (2022).

5.6.7 Determinação do efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos de uso clínico

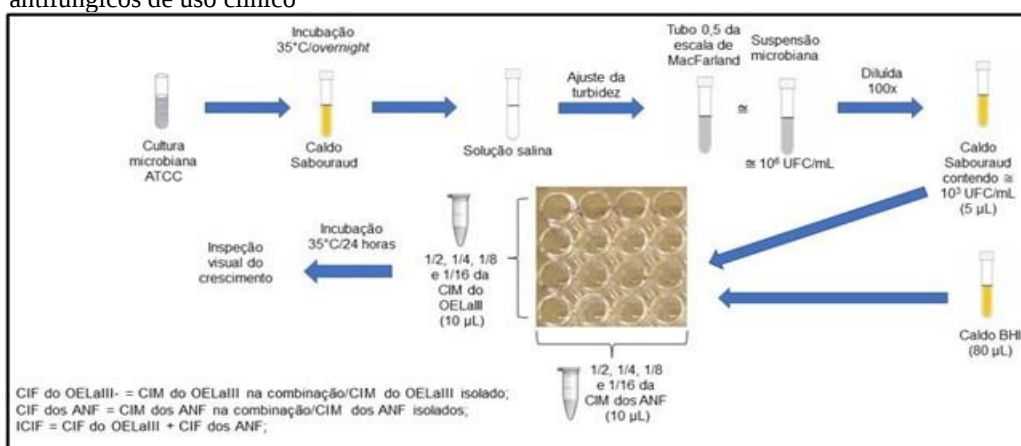
O efeito modulador do OELaIII sobre a atividade dos antifúngicos (Miconazol -

MIC, Cetoconazol – CET, Nistatina – NIS, Clotrimazol – CLO, Fluconazol – FLU , Ciclopírox olamina – CIC e Anfotericina B– ANFO) foi avaliado pelo Método de *Checkerboard*, como descrito por Cleeland e Squires (1991). Aos poços das microplacas foram adicionadas alíquotas de 5 µL de culturas microbianas, contendo aproximadamente $2,5 \times 10^3$ UFC/mL, 80 µL de CSD, 10 µL de OELaIII e 10 µL do ANF. Os valores de CIM de OELaIII e dos ANFs, previamente determinados, foram utilizados para obtenção das diferentes associações OELaIII-ANF. Concentrações finais de 1/2, 1/4, 1/8, e 1/16 x CIM de OELaIII e dos ANFs foram utilizadas no experimento. As microplacas foram incubadas durante 24 horas a 35°C e após foi realizada a inspeção visual do crescimento microbiano (Figura 9). Para analisar o efeito das associações OELaIII-ANF foram calculados os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF), como descrito por (SHIN; LIM, 2004):

$$\text{ICIF} = \text{CIF}_{\text{OELaIII}} + \text{CIF}_{\text{ANF}} = [\text{OELaIII}]/\text{CIM}_{\text{OELaIII}} + [\text{ANF}]/\text{CIM}_{\text{ANF}}.$$

Onde: [OELaIII] é a menor concentração do OELaIII na associação com atividade antifúngica, $\text{CIM}_{\text{OELaIII}}$ é a CIM de OELaIII, $\text{CIF}_{\text{OELaIII}}$ é a concentração inibitória fracionada do OELaIII, [ANF] é a menor concentração de antifúngicos na associação com atividade antimicrobiana, CIM_{ANF} é a CIM do antifúngico, CIF_{ANF} é a Concentração inibitória fracionada do antifúngico. O Índice CIF (ICIF) foi interpretado como: efeito sinérgico para $\text{ICIF} \leq 0,5$, efeito aditivo ou indiferente para $\text{ICIF} > 0,5$ e $< 1,0$, e efeito antagônico para $\text{ICIF} > 1,0$ (EUCAST, 2003).

Figura 11 – Fluxograma da determinação do efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos de uso clínico



Fonte: O autor (2022).

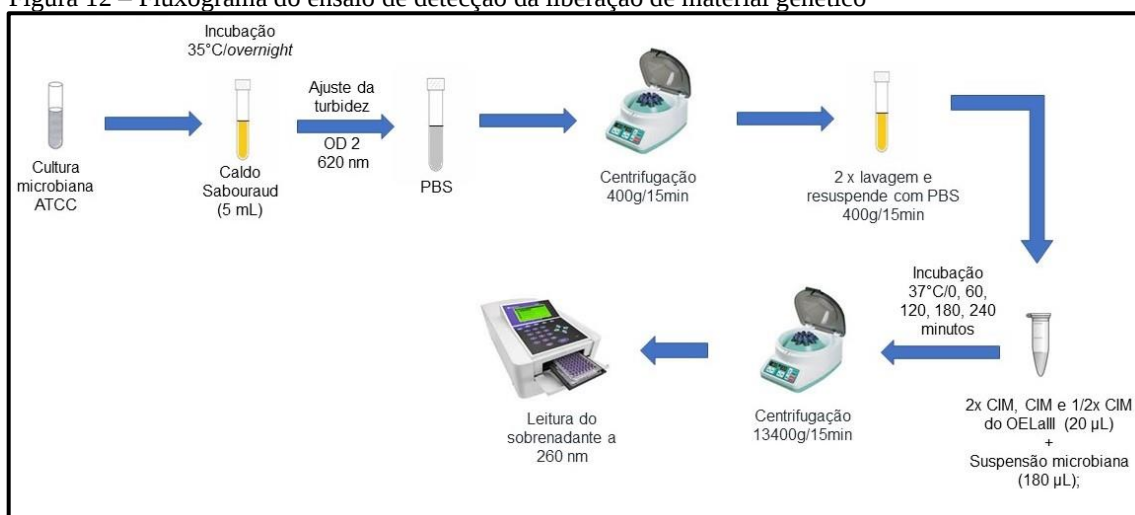
5.6.8 Ensaios de mecanismo de ação

5.6.8.1 Detecção de ocorrência de alteração na permeabilidade do envoltório celular

5.6.8.1.1 Liberação de material genético

Cerca de 5 mL de culturas microbianas, em CSD, foram incubadas *overnight* e tiveram sua densidade celular ajustada com PBS (pH 7,4) para uma OD_{620 nm} de 2. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 400 x g durante 15 min, o sobrenadante descartado, e o pellet lavado duas vezes e ressuspensão em 1 mL de PBS (pH 7,4). As suspensões celulares (180 µL) foram adicionadas de 20 µL de concentrações do OELaIII (2x CIM, CIM e 1/2x CIM). Culturas microbianas sem tratamento foram utilizadas como controle. Após incubação a 37°C nos tempos determinados (0, 60, 120, 180, 240 minutos), as suspensões celulares foram centrifugadas a 13400 × g por 15 min, e foi realizada a leitura da OD_{260 nm} do sobrenadante em leitora Biotek modelo Synergy HTX S1LFA (adaptado de DEVI *et al.*, 2010) (Figura 10).

Figura 12 – Fluxograma do ensaio de detecção da liberação de material genético



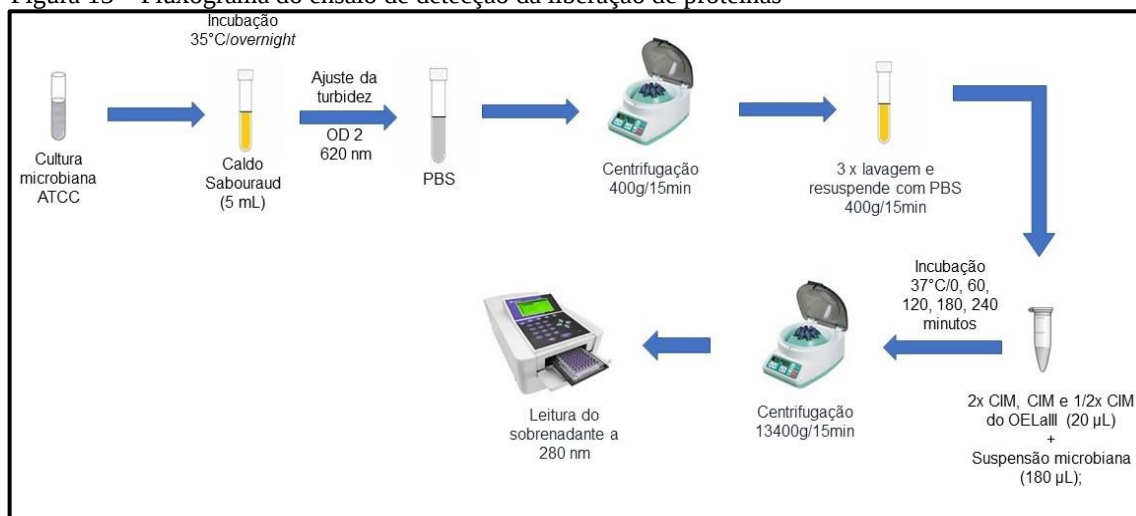
Fonte: O autor (2022).

5.6.8.1.2 Liberação de proteínas

Cerca de 5 mL de culturas microbianas, em CSD, foram incubadas *overnight* e tiveram sua densidade celular ajustada com PBS (pH 7,4) para uma OD_{620 nm} de 2. Em seguida, as células foram coletadas por centrifugação a 400 x g durante 15 min, o sobrenadante

descartado, e o pellet lavado duas vezes e ressuspensão em 1 mL de PBS (pH 7,4). As suspensões celulares (180 μ L) foram adicionadas de 20 μ L de concentrações do OELaIII (2x CIM, CIM e 1/2x CIM). Culturas microbianas sem tratamento foram utilizadas como controle. Após incubação a 37°C nos tempos determinados (0, 60, 120, 180, 240 minutos), as suspensões celulares foram centrifugadas a 4500 $\times$ g por 15 min, e foi realizada a leitura da OD_{280 nm} do sobrenadante em leitora Biotek modelo Synergy HTX S1LFA (adaptado de MOGHIMI et al., 2016) (Figura 11).

Figura 13 – Fluxograma do ensaio de detecção da liberação de proteínas



Fonte: O autor (2022).

5.6.8.1.3 Ensaio do mecanismo do sorbitol

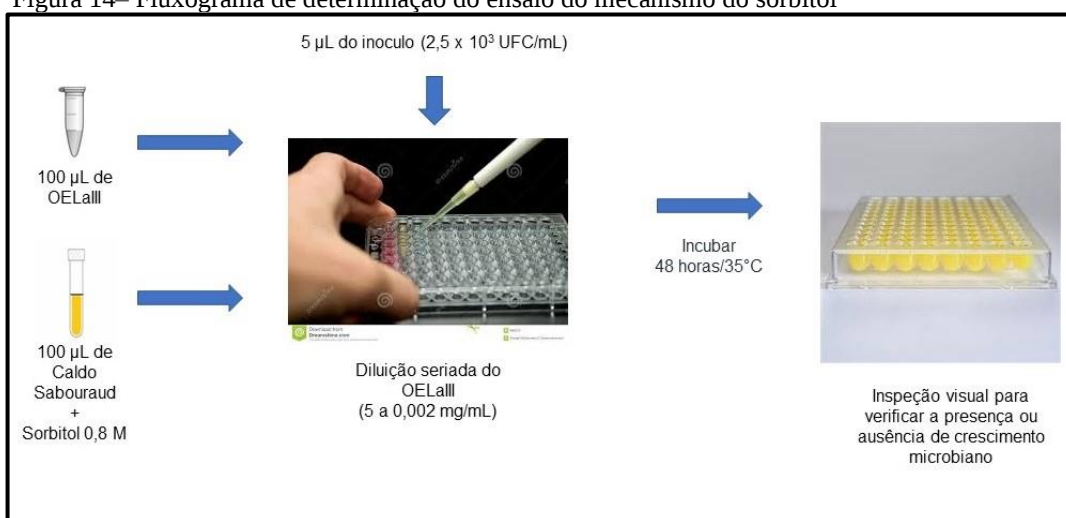
Este método se baseia na medida dos danos que compostos com atividade antifúngica causam aos componentes da parede celular fúngica. Compostos que atuam de alguma forma sob a parede celular do fungo, provocam a lise de suas células quando na ausência de um estabilizador osmótico, mas permitem seu crescimento na presença desse suporte osmótico. Dessa maneira, este ensaio compara as CIM's dos produtos antifúngicos na ausência e presença de sorbitol a 0,8 M, um protetor osmótico usado para estabilizar os protoplastos de fungos. A determinação da CIM OELaIII, na presença do sorbitol, foi realizada utilizando microplacas de 96 poços, com fundo em forma de “U” (Figura 12).

Nos poços da primeira coluna da microplaca foram adicionados 100 μ L de CSD enriquecido com sorbitol e 100 μ L de OELaIII, em soluções duplamente concentradas. Os conteúdos desses poços foram diluídos na razão de 1/2 de forma a obter concentrações de OELaIII variando de 5 mg/mL a 0,002 mg/mL e uma concentração final de 0,8 M de sorbitol.

A cada poço foram adicionados 5 μL do inóculo microbiano (aproximadamente $2,5 \times 10^3$ UFC/mL)

O controle do crescimento dos microrganismos foi realizado colocando nos poços 100 μL do meio de cultura, sorbitol 0,8 M e 5 μL do inóculo de cada espécie em estudo. O antifúngico Miconazol (20 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como controle da inibição do crescimento. As microplacas foram incubadas a 35°C por 48 horas, sendo realizada a inspeção visual para verificar a presença ou ausência de crescimento microbiano (FROST *et al.*, 1995; FERREIRA *et al.*, 2017).

Figura 14– Fluxograma de determinação do ensaio do mecanismo do sorbitol



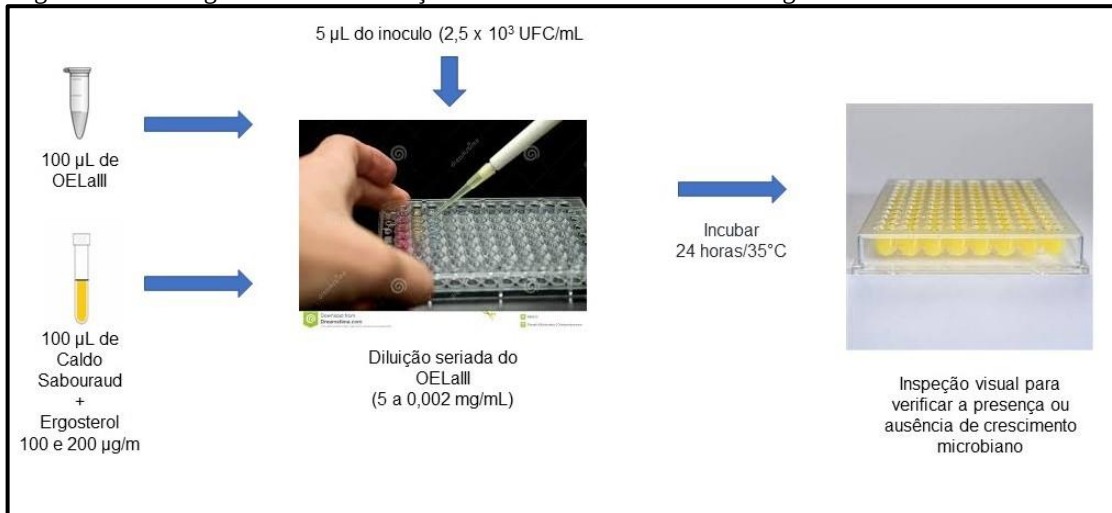
Fonte: O autor (2022).

5.6.8.1.4 Ensaio do mecanismo do ergosterol

Para determinar se o OELaIII interage com ergosterol, a CIM foi determinada sobre cepas de referência de *Candida*, pelo método de microdiluição (CLSI, 2008) na ausência e na presença do ergosterol, nas concentrações de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$, previamente adicionado ao meio de cultura. Em cada poço da microplaca, foram adicionados 100 μL de CSD. Posteriormente, 100 μL de OELaIII foram dispensados nos poços da primeira coluna da microplaca e obtidas diluição seriada, na razão de 1/2, com concentrações finais de 5 mg/mL até 0,002 mg/mL. Em seguida foram adicionados inóculos de 5 μL das cepas de *Candida*, contendo aproximadamente $2,5 \times 10^3$ UFC/mL. Para o controle do crescimento das cepas foi utilizado meio de cultura, DMSO 1% e 5 μL do inóculo de cada espécie. O Miconazol (20 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizado como controle da inibição do crescimento. As microplacas foram

incubadas a 35°C por 24 horas, sendo realizada a inspeção visual para verificar a presença ou ausência de crescimento microbiano (FROST *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 2013) (Figura 13).

Figura 15 – Fluxograma de determinação do ensaio do mecanismo do ergosterol

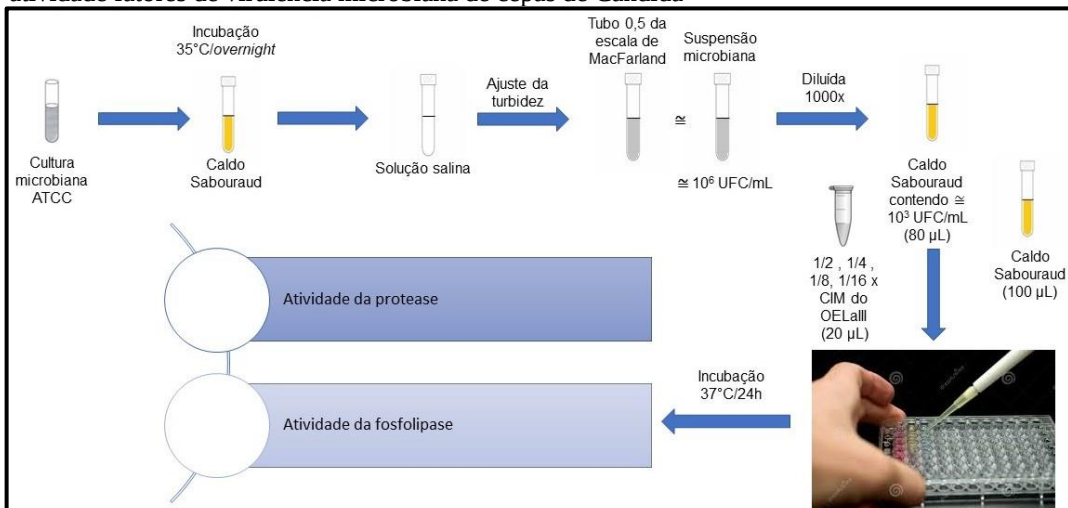


Fonte: O autor (2022).

5.6.9 Detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias de OELaIII na atividade fatores de virulência microbiana de cepas de *Candida*

Para avaliação de alterações na atividade de fatores de virulência de cepas de *Candida*, inóculos microbianos contendo aproximadamente $2,5 \times 10^3$ UFC/mL em CSD, foram previamente postos em contato com concentrações sub-inibitórias do OELaIII e incubados por 24h a 37°C (Figura 14).

Figura 16 – Fluxograma de Detecção do efeito de concentrações sub-inibitórias de OELaIII na atividade fatores de virulência microbiana de cepas de *Candida*



Fonte: O autor (2022).

5.6.9.1 Atividade da protease

A determinação da atividade de protease foi realizada de acordo com Aoki et al. (1990), em ágar contendo albumina de soro bovino (ASB). Para o preparo do meio foram utilizados 60µL de uma solução contendo 0,04g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, 0,5g de K_2HPO_4 , 1g de NaCl; 0,2g de extrato de levedura, 4g de glicose e 0,5g de ASB, e o pH da solução obtida ajustado com HCl 1N para 3,5. A solução foi esterilizada por meio de filtração e, em seguida, misturada com 140 ml de ágar estéril.

Uma alíquota de 5µL do inóculo, de cada cepa previamente exposta ao OELaIII, foi inoculado em meio de cultura e as placas incubadas a 37°C durante 7 dias. O grau da atividade da protease (AP) foi obtido de acordo com a metodologia descrita por Price et al. (1982), onde os valores do AP foram calculados dividindo o valor do diâmetro da colônia pelo valor do halo determinado pela ação das proteases mais o diâmetro da colônia. Assim, os resultados da atividade da protease das cepas de *Candida* expostas as concentrações sub-inibitórias de OELaIII foram agrupados em quatro classes: muito baixa (+; AP de 0,90-0,99), baixa (++; AP de 0,80-0,89), alta (+++; AP de 0,70-0,79) e muito alta (++++; AP de 0,69 ou inferior).

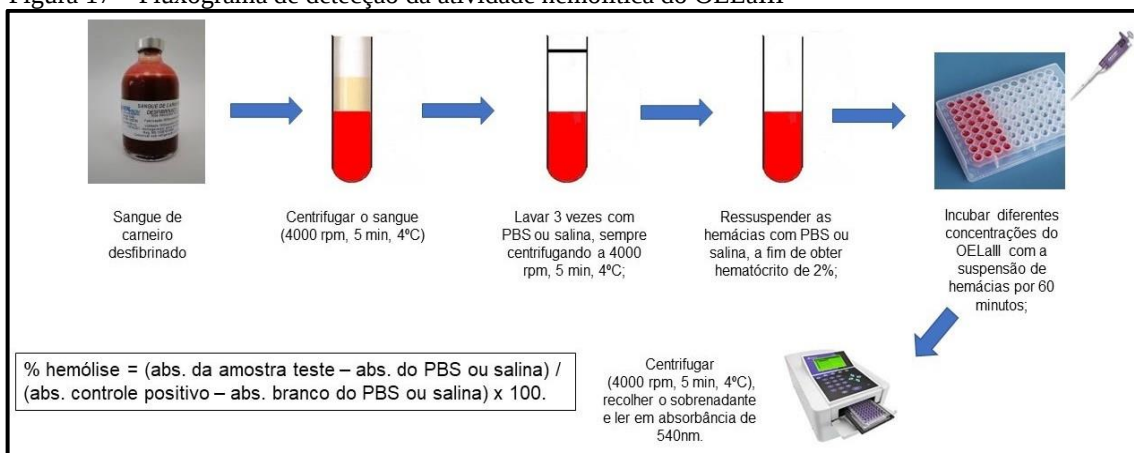
5.6.9.2 Atividade da fosfolipase

A produção de fosfolipase foi determinada de acordo com Polak (1992), usando o método de placa de ágar de gema de ovo de Price et al. (1982). O meio do teste foi ASD, contendo 1M de cloreto de sódio, 0,005 M de cloreto de cálcio e 2% de gema de ovo. Cada cepa foi exposta a concentrações sub-inibitórias do OELaIII, durante 24 horas, e inóculos de 5µL foram transferidos para o meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas a 37° C, durante 3 a 8 dias. O grau da atividade da fosfolipase (AF) foi obtido de acordo com o método descrito por Price et al. (1982), onde os valores de (AF) foram calculados dividindo o valor do diâmetro da colônia pelo valor do halo determinado pela ação da fosfolipase mais o diâmetro da colônia. Assim, os resultados da atividade da fosfolipase das cepas de *Candida* expostas a concentrações sub-inibitórias do OELaIII foram agrupados em quatro classes: muito baixa (+; AF de 0,90-0,99), baixa (++; AF de 0,80-0,89), alta (+++; AF de 0,70-0,79) e muito alta (++++; AF de 0,69 ou inferior).

5.7 Atividade hemolítica do OELaIII

O sangue de carneiro desfibrinado (Newprov) foi centrifugado a 4000 rpm, durante 5 minutos a 4°C, para separação das hemácias. O *pellet* de hemácias formado foi lavado três vezes com PBS, seguida de novas centrifugações a 4000 rpm, por 5 minutos a 4°C. As hemácias, após as lavagens, foram coletadas e ressuspensas em PBS, a fim de obter um hematócrito de 2%. O OELaIII foi incubado em diferentes concentrações (5 a 0,002 mg/mL) (20µL) com a suspensão de hemácias (180µL) por 60 minutos sob agitação frequente. Após a incubação, os eppendorfs contendo as amostras teste foram centrifugados (4000 rpm, 5 min, 4°C), e o sobrenadante recolhido e lido a absorvância de 540nm. Como controle positivo da hemólise foi utilizado o Triton X-100 (Neon) (hemólise de 100%) e como controle negativo de hemólise (PBS) (Figura 15). A taxa de hemólise foi calculada pela fórmula: % hemólise = (abs. da amostra teste – abs. do PBS) / (abs. controle positivo – abs. branco do PBS) x 100 (adaptado de WANG *et al.*, 2010).

Figura 17 – Fluxograma de detecção da atividade hemolítica do OELaIII



Fonte: O autor (2022).

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados na forma de média $\pm$ erro padrão médio (E.P.M.). As diferenças entre os grupos foram comparadas utilizando a Análise de Variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey, utilizando-se como critério $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas utilizando-se o software GraphPad Prism 6.0.

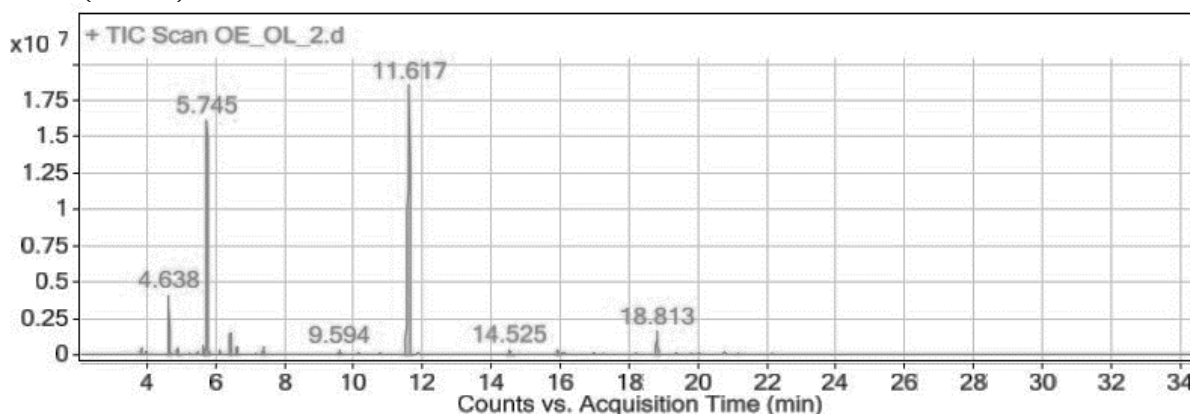
7 RESULTADOS

O óleo essencial do quimiotipo III (limonemo e carvona) de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown apresentou um ótimo espectro de ação antifúngica, sendo capaz de inibir todas as cepas de *Candida* testadas (*C. albicans* ATCC 64124, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 90029, *C. albicans* ATCC 44858, *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* ATCC 90018). De forma que essas cepas foram utilizadas para os demais ensaios microbianos: avaliação da influência do tempo exposição ao OELaIII; ação moduladora do OELaIII na atividade de antifúngicos de uso clínico; mecanismo de ação do OELaIII; efeito de concentrações de OELaIII na expressão de fatores de virulência microbianos.

7.1 Análise química do OELaIII

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-MS) do OELaIII levaram a identificação de 11 diferentes componentes, representando 99,24% do total identificado (Figura 1, Tabela 1). Os componentes majoritários foram limonemo (25,37%) e carvona (58,15%), e todos os compostos identificados pertencem à classe dos terpenos. De acordo com Matos (1996), a presença majoritária de limonemo e carvona neste óleo, permite classificá-lo como quimiotipo III (OELaIII).

Figura 18 – Cromatograma do OELaIII obtido por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas (CG-MS)



Fonte: Padetec (2018).

Tabela 1 – Constituintes químicos do OELaIII

Constituinte	T.R	I.K	I.K_E	% Total
Sabineno	4,638	976	980	5,23
Mirceno	4,892	991	993	0,59
P-cinemo	5,643	1026	1030	0,9
Limonemo	5,745	1031	1035	25,37
γ -terpineno	6,419	1062	1064	2,31
Hidrato cis-sabineno	6,617	1068	1071	0,9
Hidrato trans-sabineno	7,386	1097	1100	0,99
4-terpinenol	9,594	1177	1181	0,59
Carvona	11,617	1252	1250	58,15
β -bourboneno	15,918	1384	1388	0,71
γ -muuruleno	18,813	1477	1484	3,5
Total identificado				99,24%

T.R: tempo de retenção (min). I.K: Índice de Kovats da literatura. I.K_E: Índice de Kovats experimental.
 Fonte: Padetec (2018).

7.2 Ensaios microbiológicos

7.2.1 Concentrações inibitória e letal mínimas do OELaIII e antifúngicos

Para a determinação de CIM e CLM de OELaIII e dos antifúngicos (Miconazol - MIC, Cetoconazol - CET, Nistatina - NIS, Clotrimazol - CLO, Fluconazol - FLU, Ciclopírox olamina - CIC e Anfotericina B - ANFO) (Tabela 3) foram utilizados os métodos de microdiluição em caldo de cultura (CLSI, 2008), em microplacas de 96 poços, e de contagem de células viáveis (BARON; PETERSON; FINEGOLD, 1994), respectivamente. O OELaIII foi testado nas concentrações de 5 a 0,002 mg/mL e os antifúngicos nas concentrações de 160 a 0,078 μ g/mL para as cepas *C. albicans* ATCC 64124, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 90029, *C. albicans* ATCC 44858, *C. albicans* ATCC 10231, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. tropicalis* ATCC 13803 e *C. parapsilosis* ATCC. O OELaIII foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas com CIM e CLM variando de 1,25 a 0,078 mg/mL (Tabela 2).

Tabela 2 – CIM e CLM de OELaIII para cepas de referência de *Candida*, determinadas pelas técnicas da microdiluição em caldo de cultura e de contagem de células viáveis, respectivamente

CEPAS	OELaIII (mg/mL)	
	CIM	CLM
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,078	0,078
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,625	0,625
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	0,312	0,312
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	0,625	0,625
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,625	0,625
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,625	0,625
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	1,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0,156	0,156

Controles: Tween 80 a 1%, Miconazol 20µg/mL, meio de cultura. A CIM - Concentração Inibitória Mínima; CLM- Concentração Letal Mínima.

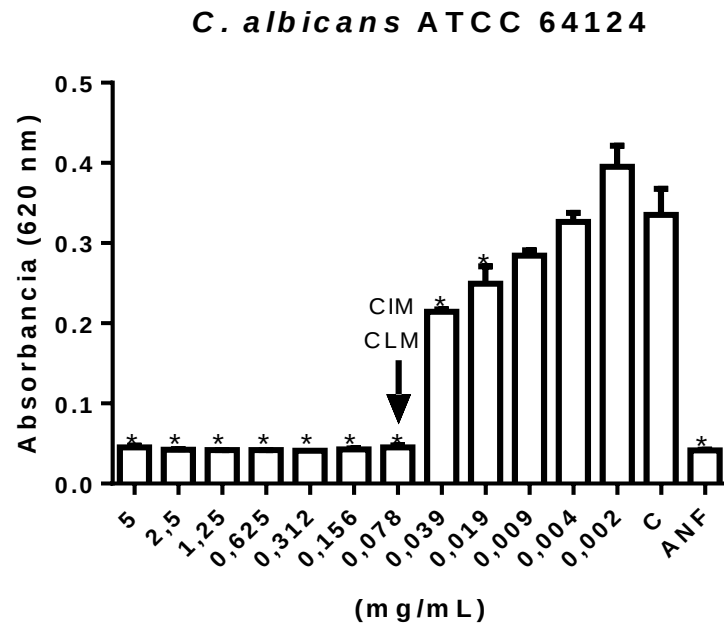
Fonte: O autor (2022).

Os valores de CIM foram obtidos por observação a “olho nu” (ausência de turvação visível) (Tabela 3) e por medida de absorbância a 620 nm em leitora de Elisa (Gráficos 1 a 8).

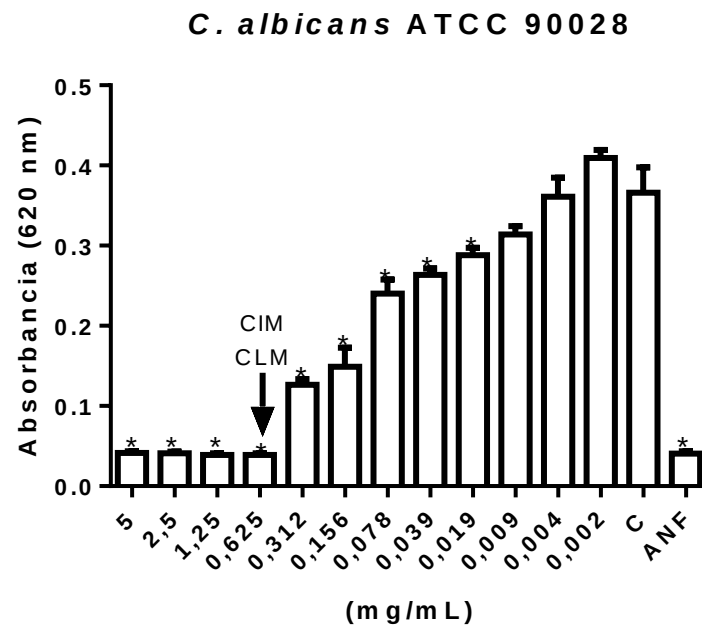
Tabela 3 – CIM e CLM dos antifúngicos para as cepas de referência de *Candida*, determinadas pelas técnicas da microdiluição em caldo de cultura e de contagem de células viáveis, respectivamente

CEPAS	CET (µg/mL)		MIC (µg/mL)		NIS (µg/mL)		CLO (µg/mL)		FLU (µg/mL)		CIC (µg/mL)		ANFO (µg/mL)	
	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM	CIM	CLM
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,312	0,312	10	10	10	20	0,078	0,156	Nd	Nd	0,078	0,156	1,25	2,5
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	5	5	0,156	0,156	10	20	0,312	0,625	Nd	Nd	0,312	0,625	0,625	2,5
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	40	40	0,078	0,078	10	10	0,078	0,078	5	5	0,078	0,078	0,625	1,25
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	10	10	0,078	0,078	5	10	0,156	0,625	Nd	Nd	0,156	0,625	0,625	1,25
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	20	20	0,625	0,625	5	5	0,078	0,312	Nd	Nd	0,078	0,312	0,156	0,312
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	1,25	1,25	1,25	1,25	10	10	0,312	0,625	Nd	Nd	0,312	0,625	5	20
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	1,25	0,156	0,156	20	20	5	10	Nd	Nd	5	10	10	20
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0,078	0,078	0,078	0,078	5	10	0,078	0,312	0,312	1,25	0,078	0,312	1,25	2,5

Controle: DMSO a 1%. A CIM foi considerada a menor concentração dos ANF, capaz de inibir o crescimento das cepas de *Candida*, com ausência de turvação visível e a CLM foi considerada a menor concentração de ANF, capaz de eliminar 99,9% do crescimento celular. Nd (não determinada dentro da faixa de concentração utilizada no experimento).
Fonte: O autor (2022).

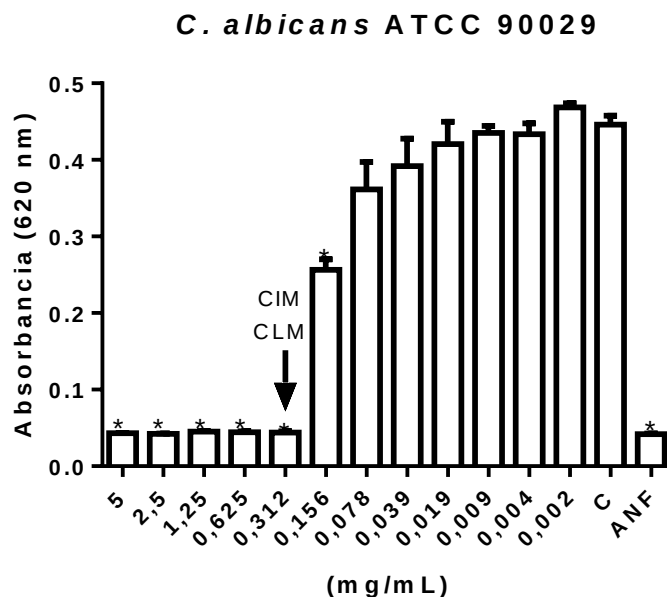
Gráfico 1 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. albicans*

Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 μ g/ml).
 Fonte: O autor (2022).

Gráfico 2 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. albicans* ATCC 90028

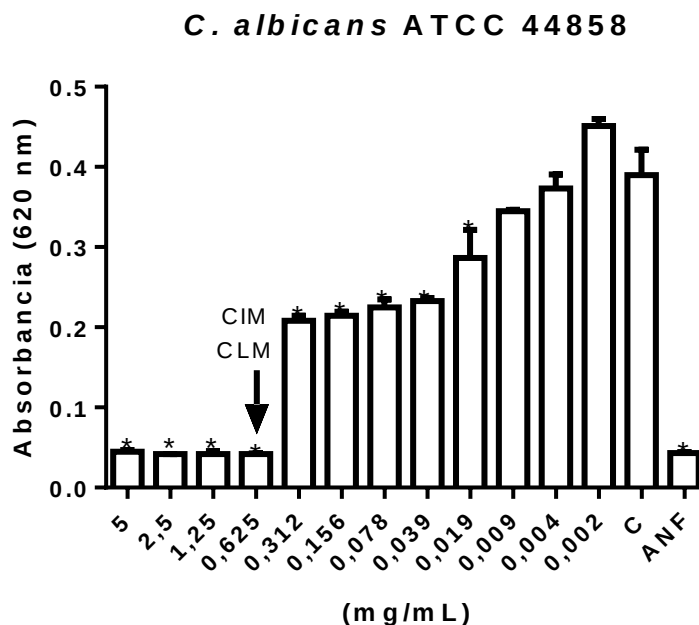
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 μ g/ml).
 Fonte: O autor (2022).

Gráfico 3 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. albicans* ATCC 90029



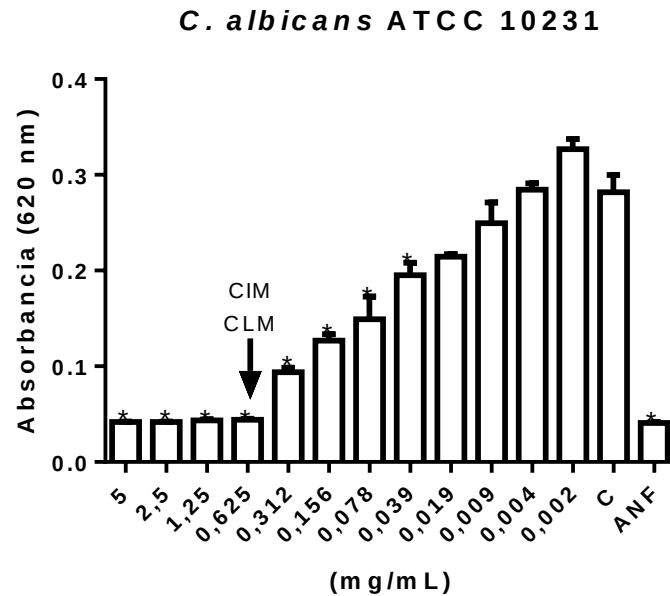
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 μ g/ml). Fonte: O autor (2022).

Gráfico 4 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. albicans* ATCC 44858



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 μ g/ml). Fonte: O autor (2022).

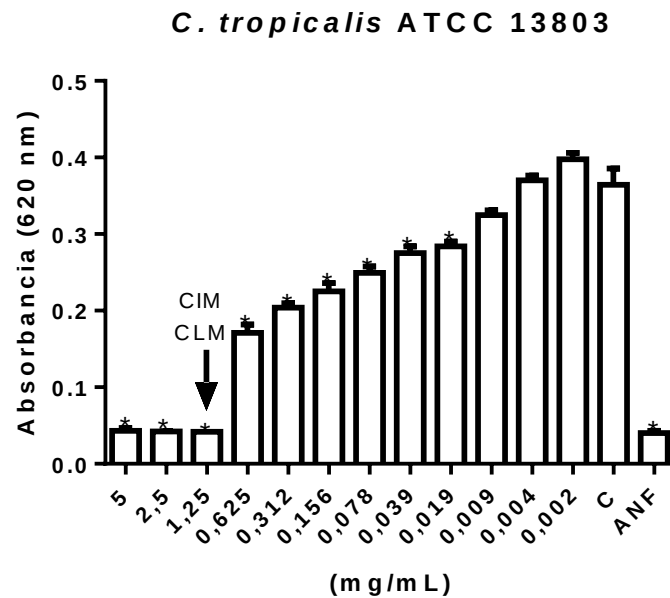
Gráfico 5 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. albicans* ATCC 10231



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 μ g/ml).

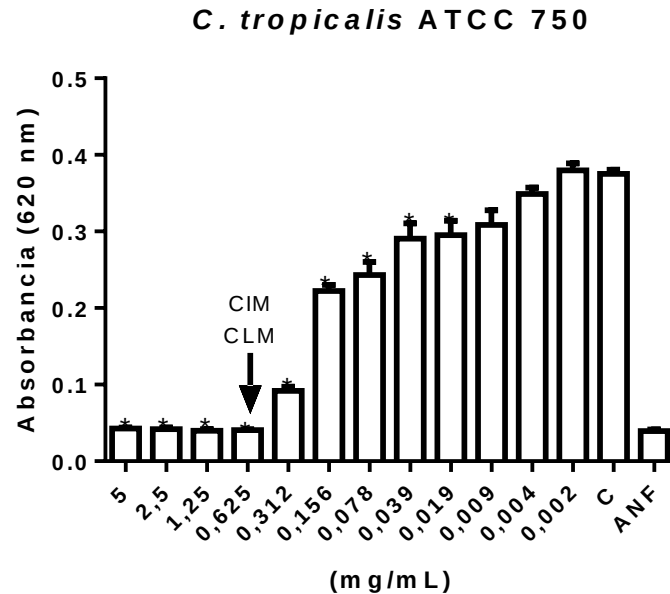
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 6 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803



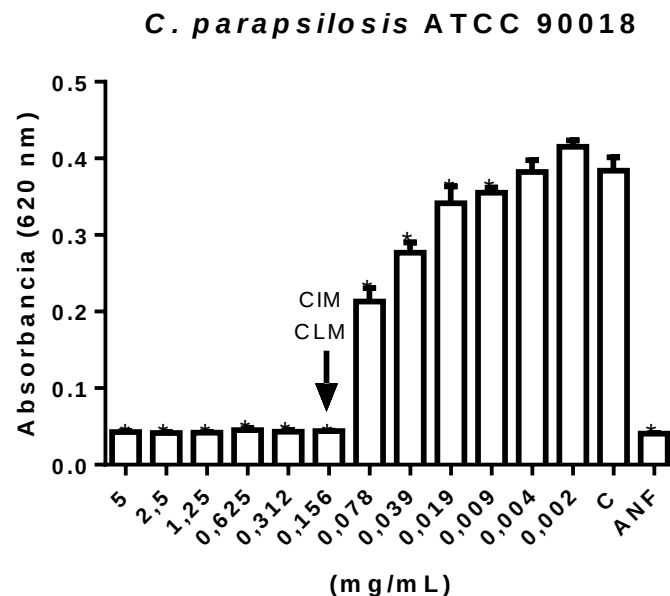
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 μ g/ml).
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 7 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. tropicalis* ATCC 750



Os valores representam a média + EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 µg/ml).
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 8 – Atividade antifúngica do OELaIII sobre a cepa *C. parapsilosis* ATCC 90018

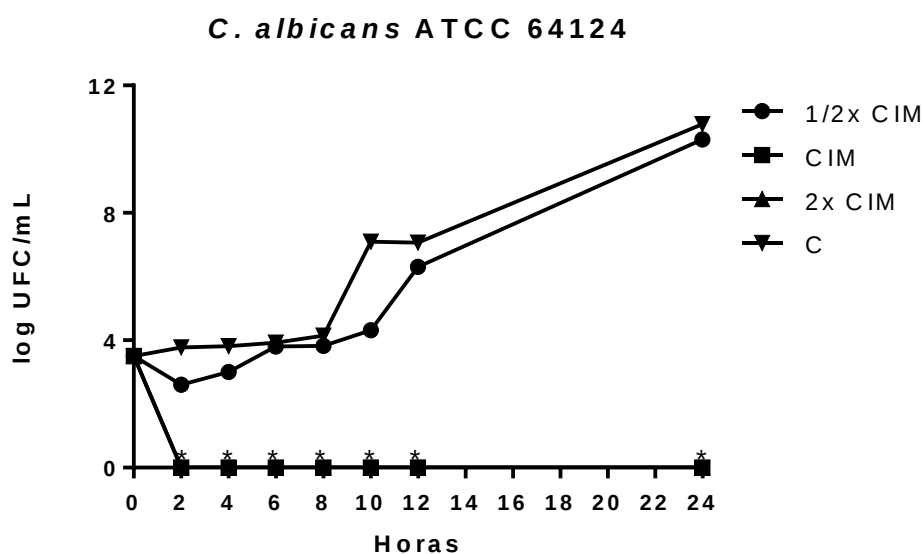


Os valores representam a média + EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle de não inibição do crescimento (C = Caldo Sabouraud + inoculo microbiano). ANF (Miconazol 20 µg/ml).
Fonte: O autor (2022).

7.2.2 Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade microbiana

Os gráficos 9 a 16 mostram o efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade das cepas de *Candida* testadas, sendo os valores expressos em log UFC/mL em função do tempo.

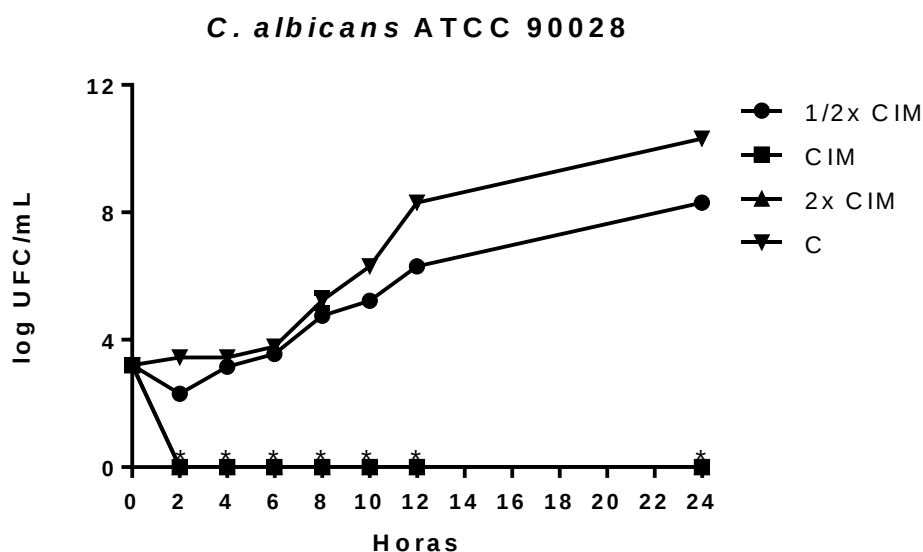
Gráfico 9 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. albicans* ATCC 64124



● (1/2x CIM: 0,039 mg/mL) ■ (CIM: 0,078 mg/mL), ▲ (2x CIM: 0,156 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.

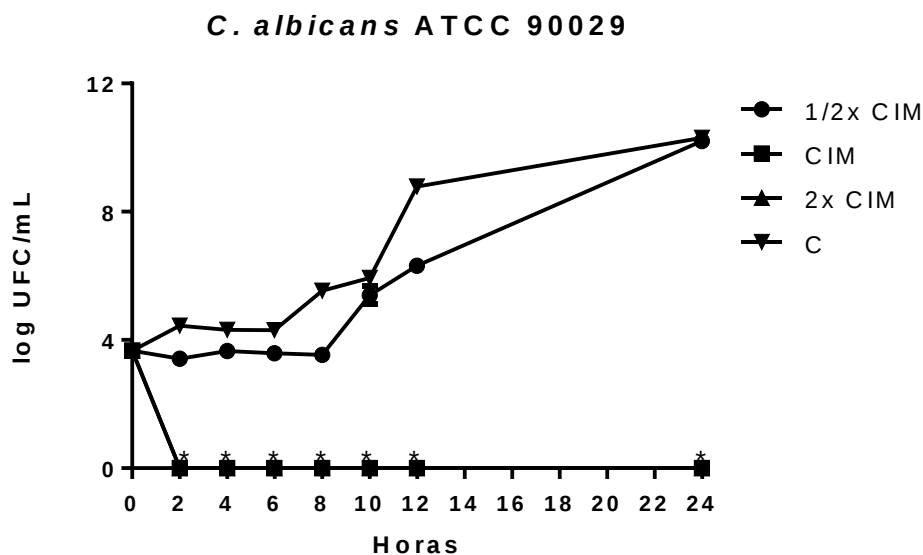
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 10 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. albicans* ATCC 90028



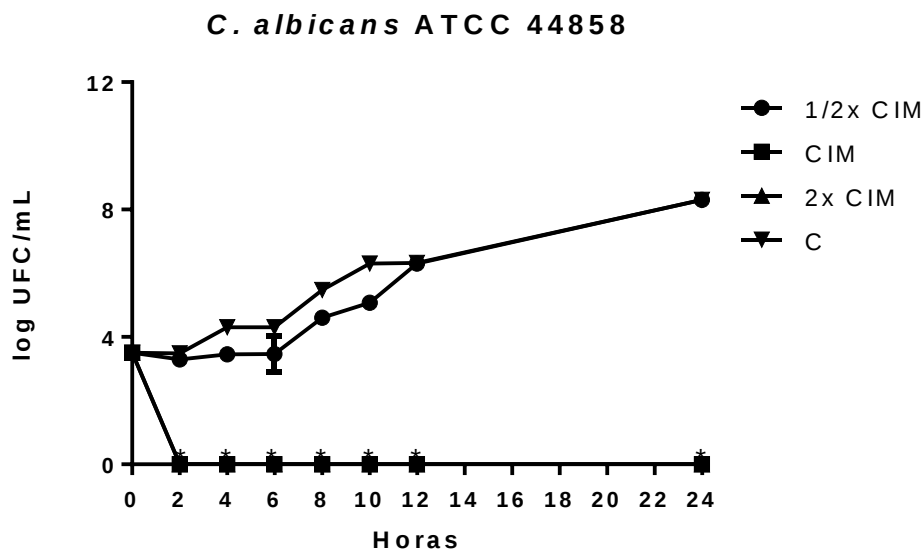
● (1/2x CIM: 0,312 mg/mL) ■ (CIM: 0,625 mg/mL), ▲ (2x CIM: 1,25 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 11 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. albicans* ATCC 90029



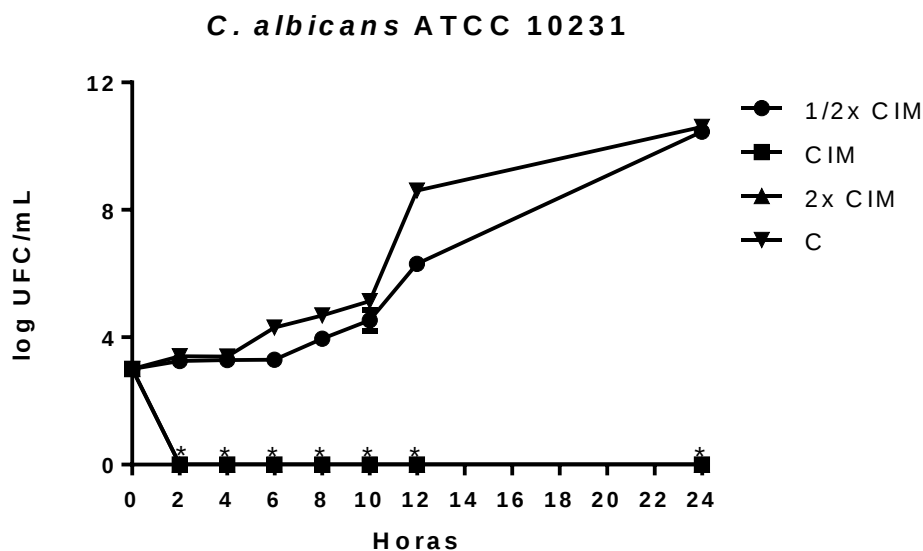
● (1/2x CIM: 0,156 mg/mL) ■ (CIM: 0,312 mg/mL), ▲ (2x CIM: 0,625 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 12 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. albicans* ATCC 44858



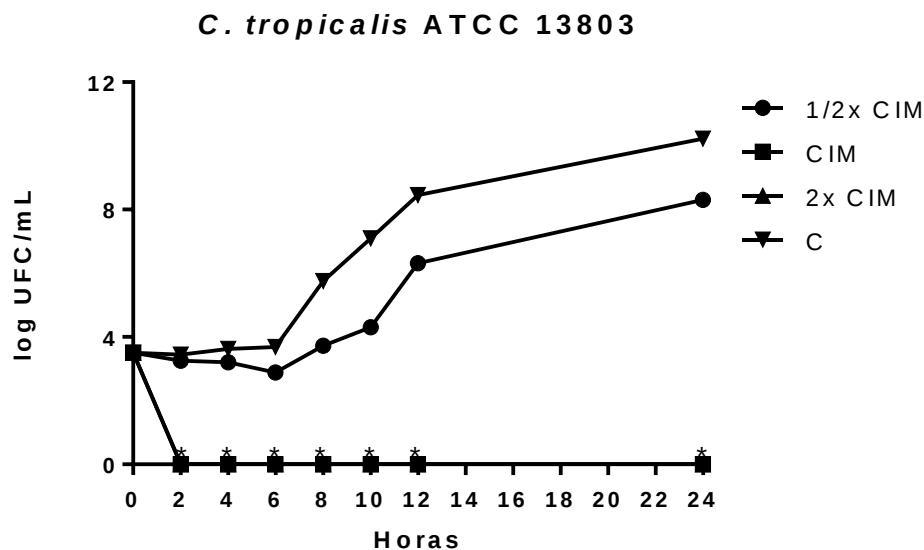
● (1/2x CIM: 0,312 mg/mL) ■ (CIM: 0,625 mg/mL), ▲ (2x CIM: 1,25 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 13 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. albicans* ATCC 10231



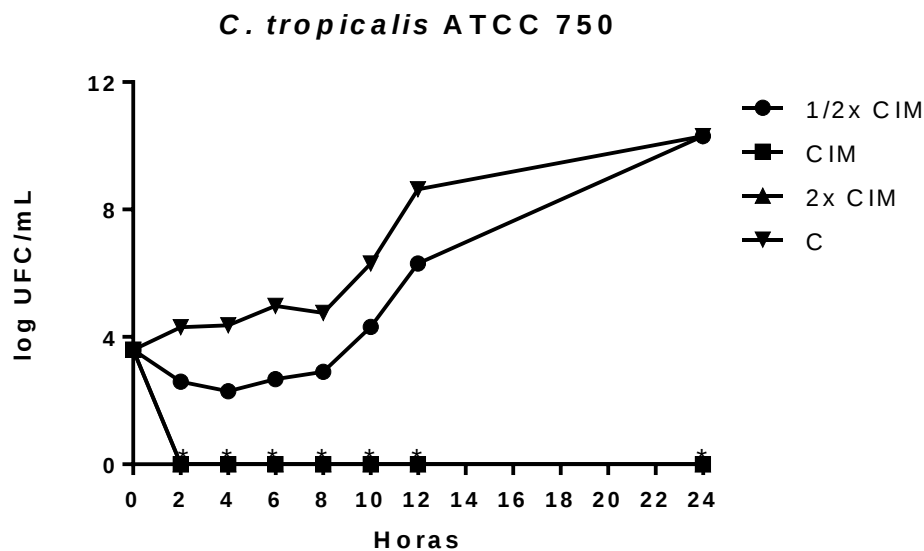
● (1/2x CIM: 0,312 mg/mL) ■ (CIM: 0,625 mg/mL), ▲ (2x CIM: 1,25 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 14 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. tropicalis* ATCC 13803



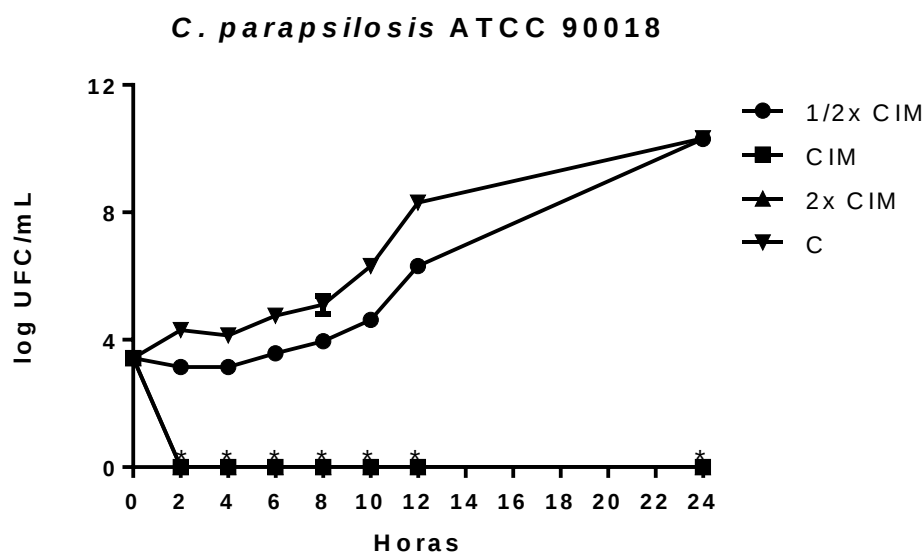
● (1/2x CIM: 0,625 mg/mL) ■ (CIM: 1,25 mg/mL), ▲ (2x CIM: 2,5 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 15 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. tropicalis* ATCC 750



● (1/2x CIM: 0,312 mg/mL) ■ (CIM: 0,625 mg/mL), ▲ (2x CIM: 1,25 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 16 – Efeito do tempo de exposição ao OELaIII na viabilidade de *C. parapsilosis* ATCC 90018



● (1/2x CIM: 0,078 mg/mL) ■ (CIM: 0,156 mg/mL), ▲ (2x CIM: 0,312 mg/mL) ▼ (C: sem tratamento). Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$.
Fonte: O autor (2022).

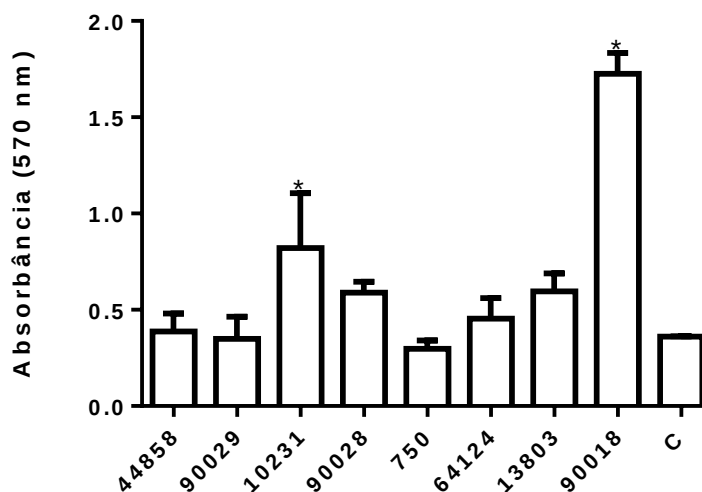
O crescimento celular de todas as cepas de *Candida* foi totalmente inviabilizado após exposição por um período de 2 horas para concentrações de OELaIII iguais a CIM e 2x CIM, com redução de cerca de 3 logs. Quando aplicado em concentrações iguais a 1/2x CIM, o OELaIII apresentou perfis de inibição distintos e sem significância estatística quando comparado ao controle sem tratamento. O maior declínio no número de células viáveis expostas a concentração de 1/2x CIM foi observado no intervalo de até 10 horas, para a cepa *C. tropicalis* ATCC 750.

7.2.3 Aderência e a formação de biofilme

Os microrganismos foram avaliados quanto à aderência e formação de biofilme. A cepa *C. parapsilosis* ATCC 90018 apresentou a maior formação de biofilme, sendo classificada como forte produtora. A cepa *C. albicans* ATCC 10231 se apresentou como moderada produtora de biofilme, enquanto *C. albicans* ATCC 44858, *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC 64124 e *C. tropicalis* ATCC 13803 foram classificadas como fracas produtoras. As cepas *C. albicans* ATCC 90029 e *C. tropicalis* ATCC 750 não produziram biofilme (não produtoras) (Gráfico 17, Tabela 4). Desta forma, foram selecionadas as cepas *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 13803, de acordo com a

capacidade de produção de biofilme, para serem utilizadas no estudo do potencial anti-biofilme do OELaIII.

Gráfico 17 – Cepas de *C. albicans* quanto à aderência e formação de biofilme



Os valores representam a média $\pm$ EPM. 44858 (*C. albicans* ATCC 44858), 90029 (*C. albicans* ATCC 90029), 10231 (*C. albicans* 10231), 90028 (*C. albicans* ATCC 90028), 750 (*C. tropicalis* ATCC 750), 64124 (*C. albicans* ATCC 64124), 13803 (*C. tropicalis* ATCC 13803), 90018 (*C. parapsilosis* ATCC 90018), C (Controle). * $p < 0.05$ comparado com o controle - C (sem tratamento).
Fonte: O autor (2022).

Tabela 4 – Classificação das cepas de *C. albicans* quanto à aderência do biofilme

Cepa	Média da OD (570 nm)	Classificação
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	1,725	Forte produtor
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,821	Moderado produtor
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	0,595	Fraco produtor
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,589	Fraco produtor
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,454	Fraco produtor
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	0,387	Fraco produtor
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	0,349	Não produtor
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,297	Não produtor
Controle	0,361	

A média dos valores de absorbância (570 nm) do controle negativo: ODc = 0,361. As cepas foram classificadas como não produtores de biofilme ($OD \leq ODc$), produtores fracos ($ODc < OD \leq 2 \times ODc$), produtores moderados ($2 \times ODc < OD \leq 4 \times ODc$) e fortes produtores ($4 \times OD < ODc$).

Fonte: O autor (2022).

7.2.4 Concentração Inibitória Mínima de Formação do Biofilme (CIMB)

A CIMB foi considerada a menor concentração de OELaIII capaz de inibir a formação de biofilme. Para as cepas de *Candida* testadas, os valores de CIMB do OELaIII

foram: *C. albicans* ATCC 10321 (0,625 mg/mL), *C. tropicalis* ATCC 13803 (1,25 mg/mL) e *C. parapsilosis* ATCC 90018 (0,156 mg/mL). A concentração de CIMB foi equivalente à CIM e a CLM obtidas nos ensaios com células planctônicas (Tabela 5, Gráficos 18 a 20).

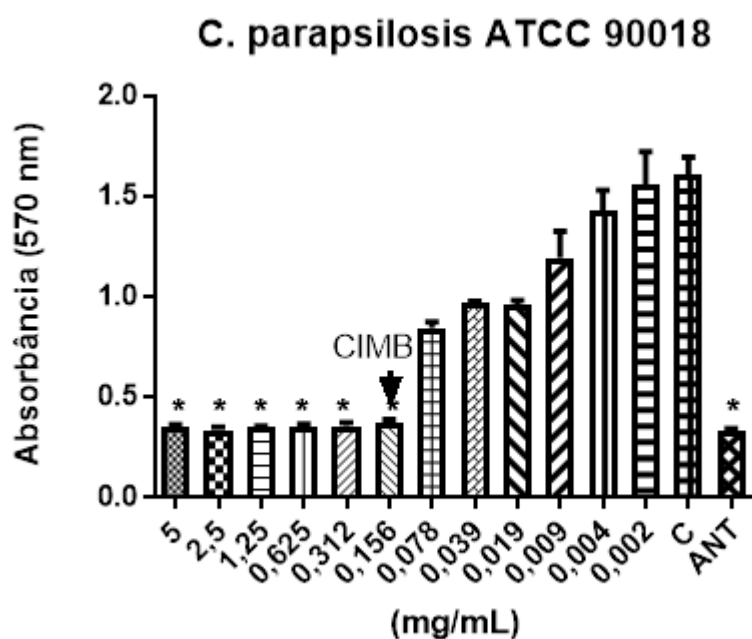
Tabela 5 – CIMB do OELaIII para cepas de referência de Candida

MICROORGANISMO	OELaIII (mg/mL)
	CIMB
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,625
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0,156

Controle: Tween 80 a 1% e Miconazol 20 µg/mL. CIMB foi considerada a menor concentração de OELaIII capaz de inibir a formação de biofilme fúngico.

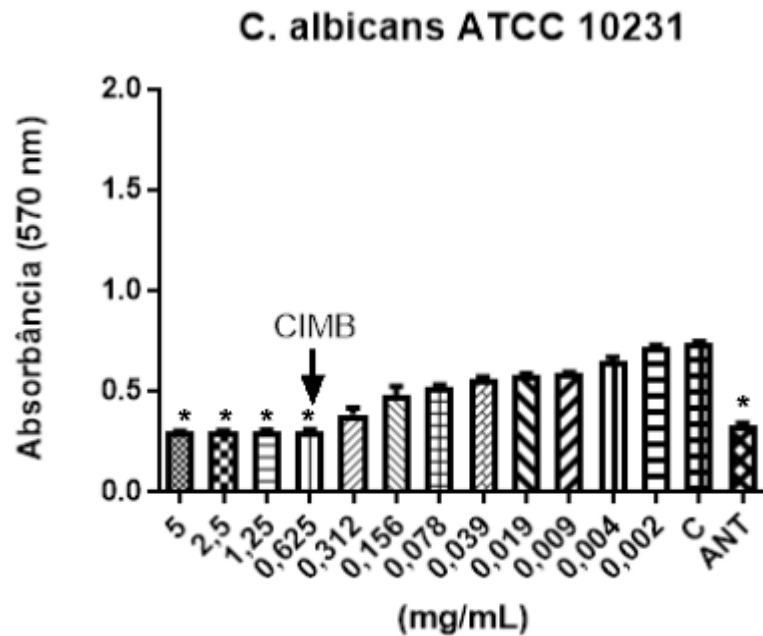
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 18 – CIMB de OELaIII para *C. parapsilosis* ATCC 90018



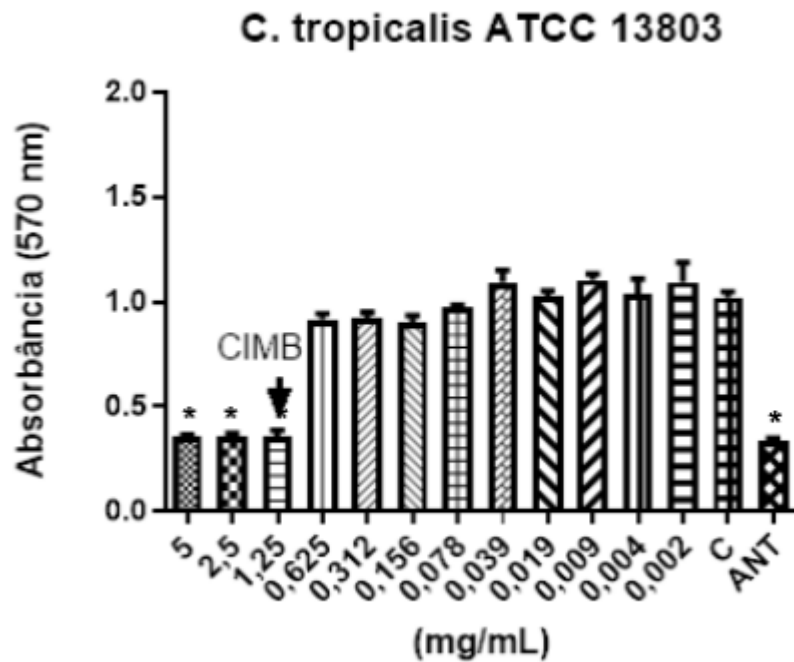
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle - C (sem tratamento). ANT (Miconazol 20 µg/mL). A CIMB foi determinada pela medida da densidade ótica em leitora de ELISA (BioTek) a 570nm.

Fonte: O autor (2022).

Gráfico 19 – CIMB de OELaIII para *C. albicans* ATCC 10231

Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle - C (sem tratamento). ANT (Miconazol 20 $\mu\text{g/mL}$). A CIMB foi determinada pela medida da densidade ótica em leitora de ELISA (BioTek) a 570nm.

Fonte: O autor (2022).

Gráfico 20 – CIMB de OELaIII para *C. tropicalis* ATCC 13803

Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0.05$ comparado com o controle - C (sem tratamento). ANT (Miconazol 20 $\mu\text{g/mL}$). A CIMB foi determinada pela medida da densidade ótica em leitora de ELISA (BioTek) a 570nm.

Fonte: O autor (2022).

Além de avaliarmos o potencial de inibir a formação do biofilme, foi avaliada a capacidade do OELaIII agir sobre biofilme previamente formado.

7.2.5 Concentração Mínima de Erradicação do Biofilme (CMEB)

A CMEB foi considerada a menor concentração de OELaIII capaz de erradicar o crescimento microbiano já formado em biofilme. A CMEB de OELaIII apresentou o mesmo valor (5 mg/mL) para todas as cepas de *Candida* testadas (Tabela 6, Gráficos 21-23).

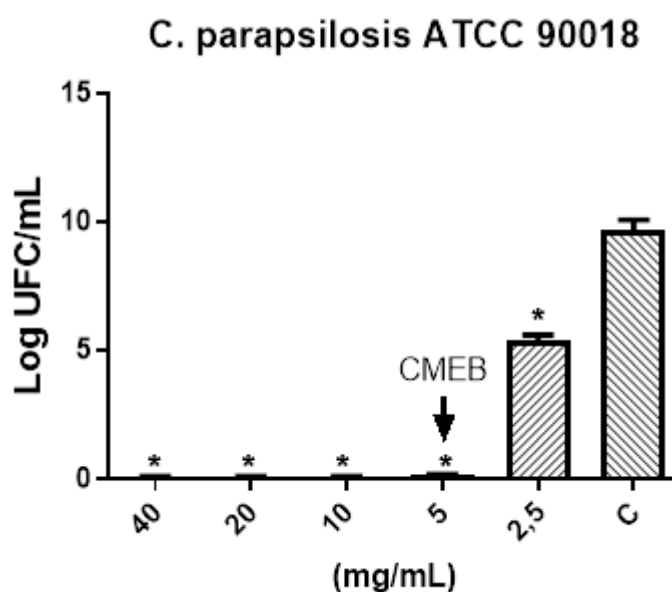
Tabela 6 – CMEB de OELaIII para cepas padrão de *Candida*

MICROORGANISMO	OELaIII (mg/mL)
	CMEB
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	5
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	5

Controle: Tween 80 a 1% e Miconazol 20 µg/mL. CMEB foi considerada a menor concentração do OELaIII capaz de erradicar o biofilme microbiano formado.

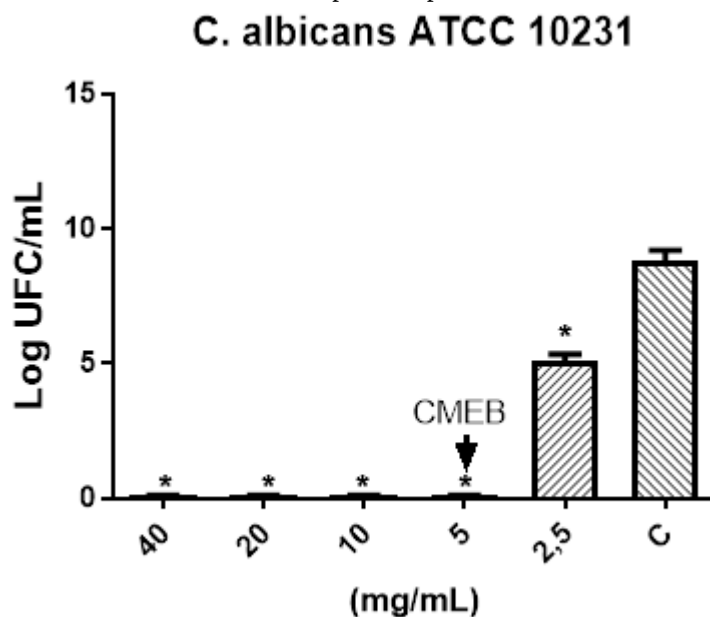
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 21 – CMEB do OELaIII para a cepa *C. parapsilosis* ATCC 90018



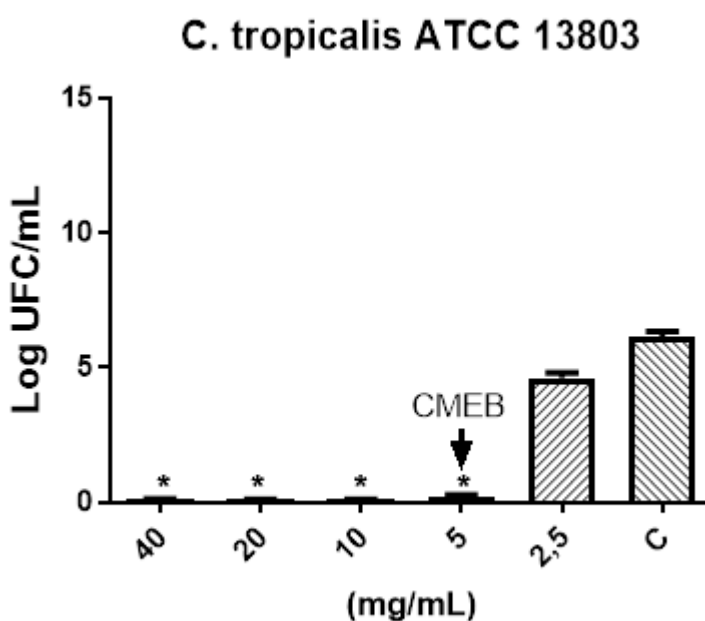
A viabilidade do biofilme remanescente foi avaliada pela contagem de colônias em Ágar Plate-count. Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. Controle (C): biofilme maduro de 48h. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

Fonte: O autor (2022).

Gráfico 22 – CMEB do OELaIII para a cepa *C. albicans* ATCC 10231

A viabilidade do biofilme remanescente foi avaliada pela contagem de colônias em Ágar Plate-count. Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. Controle (C): biofilme maduro de 48h. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.

Fonte: O autor (2022).

Gráfico 23 – CMEB do OELaIII para a cepa *C. tropicalis* ATCC 13803

A viabilidade do biofilme remanescente foi avaliada pela contagem de colônias em Ágar Plate-count. Os valores estão expressos pela média $\pm$ EPM. Controle (C): biofilme maduro de

48h. A análise foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey e valor de $*p < 0,05$ quando comparado ao controle.
Fonte: O autor (2022).

7.2.6 Efeito modulador do OELaIII na atividade de antifúngicos clínicos pelo método *Checkerboard*

A interferência do OELaIII na atividade de ANF (Miconazol - MIC, Cetoconazol – CET, Nistatina – NIS, Clotrimazol – CLO, Fluconazol – FLU, Ciclopirox olamina – CIC e Anfotericina B – ANFO) foi avaliada pelo Método de *Checkerboard*. Para o cálculo dos índices de CIF (ICIF) foram utilizadas as menores concentrações de OELaIII e dos ANF contidas nas associações capazes de inibir o crescimento visual das cepas testadas (Tabelas 7 a 13). O tipo de interação das associações de OELaIII e ANF pode ser visualizado graficamente na forma de isobogramas (Gráficos 24-30). Para construção dos gráficos isobogramas foram utilizados os valores de CIF do OELaIII e dos ANF. As associações nas quais ocorre interação indiferente ou aditiva podem ser vistas como pontos entre as duas linhas CIF (0,5; 0,5) e CIF (1;1), as situações de sinergismo são visualizadas como pontos abaixo da linha pontilhada CIF (0,5; 0,5). O efeito é antagonístico é representado por pontos situados acima da linha tracejada CIF (1;1).

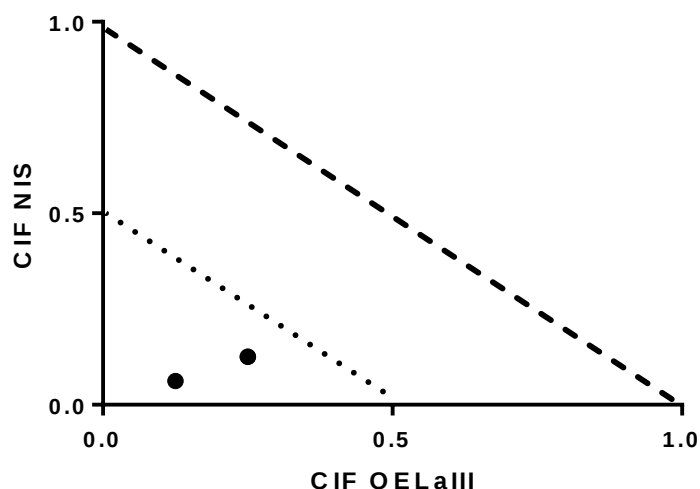
Tabela 7 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica da Nistatina (NIS) sobre cepas de *Candida*

Microrganismo	CIM _{OELaIII}		CIF _{OELaIII}	CIM _{NIS}		CIF _{NIS}	ICIF	Efeito
	I	A		I	A			
<i>C. albicans</i>	0,078	0,019	0,25	10	1,25	0,125	0,375	Sinergismo
ATCC 64124	0,078	0,019	0,25	10	1,25	0,125	0,375	Sinergismo
	0,078	0,0097	0,125	10	0,625	0,062	0,187	Sinergismo
	0,078	0,0097	0,125	10	0,625	0,062	0,187	Sinergismo

CIM_{OELaIII}: CIM do OELaIII (mg/mL); CIM_{NIS}: CIM da NIS (µg/mL). I: OELaIII ou NIS isolados; A: associação OELaIII-NIS. CIF_{OELaIII} = CIM do OELaIII na associação/CIM do OELaIII isolado. CIF_{NIS} = CIM da NIS na associação/CIM da NIS isolada. ICIF = CIF_{OELaIII} + CIF_{NIS}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.
Fonte: O autor (2022).

As associações OELaIII-NIS inibiram apenas a cepa *C. albicans* ATCC 64124, modulando sinergicamente a ação da NIS, com 100% de efeitos sinérgicos.

Gráfico 24 – Isoblograma mostrando o efeito das associações OELaIII-NIS, na inibição do crescimento de cepa da *C. albicans* ATCC 64124



Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

Fonte: O autor (2022).

Tabela 8 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Cetoconazol (CET) sobre cepas de *Candida*

Microrganismo	CIM _{OELaIII}		CIF _{OELaIII}	CIM _{CET}		CIF _{CET}		ICIF	Efeito
	I	A		I	A	I	A		
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,078	0,039	0,5	0,312	0,156	0,5	1		Antagonismo
	0,078	0,039	0,5	0,312	0,078	0,25	0,75		Indiferente
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,625	0,039	0,062	5	1,25	0,25	0,312		Sinergismo
	0,625	0,039	0,062	5	0,625	0,125	0,187		Sinergismo
	0,625	0,078	0,125	5	0,625	0,125	0,25		Sinergismo
	0,625	0,078	0,125	5	0,312	0,062	0,187		Sinergismo
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	0,312	0,039	0,125	40	5	0,125	0,250		Sinergismo
	0,312	0,019	0,062	40	5	0,125	0,187		Sinergismo
	0,312	0,039	0,125	40	2,5	0,062	0,187		Sinergismo
	0,312	0,019	0,062	40	2,5	0,062	0,124		Sinergismo
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	0,625	0,156	0,25	10	2,5	0,25	0,5		Sinergismo
	0,625	0,156	0,25	10	2,5	0,25	0,5		Sinergismo
	0,625	0,078	0,125	10	1,25	0,125	0,25		Sinergismo
	0,625	0,039	0,062	10	0,625	0,062	0,124		Sinergismo
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,625	0,039	0,062	20	1,25	0,062	0,124		Sinergismo
	0,625	0,039	0,062	20	2,5	0,125	0,187		Sinergismo
	0,625	0,078	0,125	20	2,5	0,125	0,25		Sinergismo
	0,625	0,078	0,125	20	1,25	0,062	0,187		Sinergismo
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	0,625	0,5	1,25	0,625	0,5	1		Antagonismo
	1,25	0,625	0,5	1,25	0,625	0,5	1		Antagonismo
	1,25	0,312	0,25	1,25	0,312	0,25	0,5		Sinergismo
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,625	0,312	0,5	1,25	0,625	0,5	1		Antagonismo

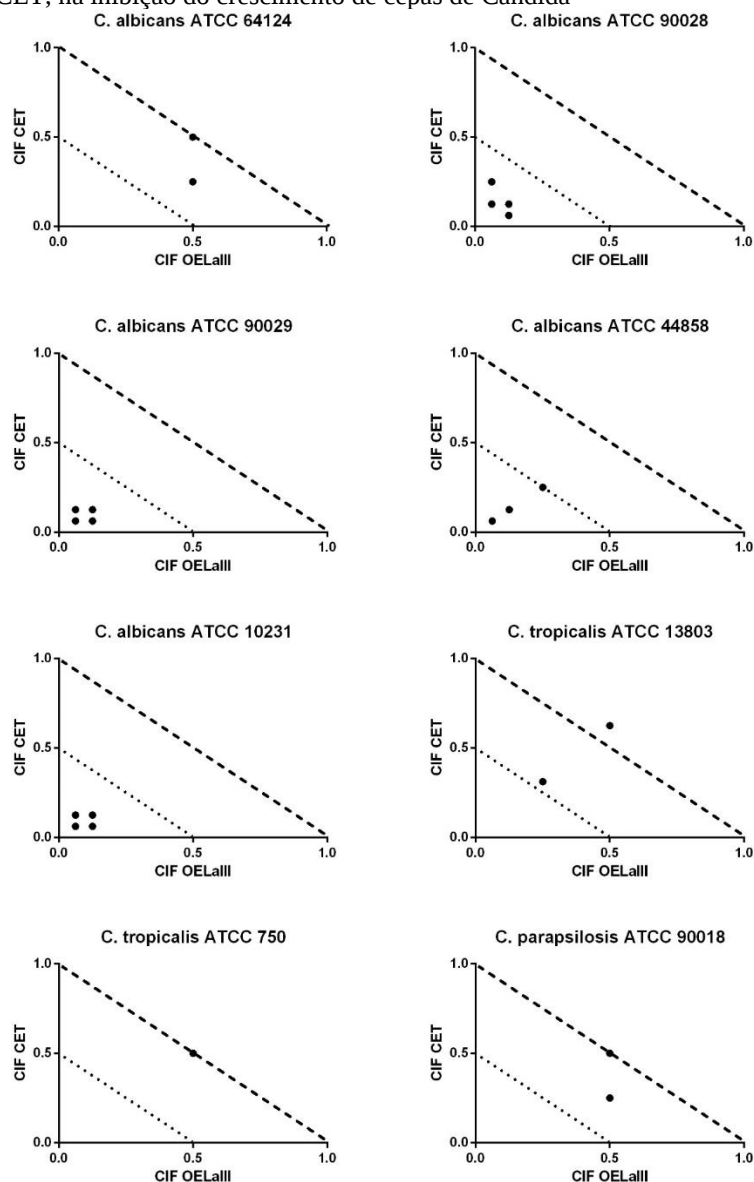
<i>C. parapsilosis</i>	0,156	0,078	0,5	0,078	0,039	0,5	1	Antagonismo
ATCC 90018	0,156	0,078	0,5	0,078	0,019	0,25	0,75	Indiferente

CIM_{OELaIII}: CIM do OELaIII (mg/mL); CIM_{CET}: CIM do CET (µg/mL). I: OELaIII ou CET isolados; A: associação OELaIII-CET. CIF_{OELaIII} = CIM do OELaIII na associação/CIM do OELaIII isolado. CIF_{CET} = CIM do CET na associação/CIM do CET isolado. Índice CIF = CIF_{OELaIII} + CIF_{CET}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF >0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003). – (Não determinada para a faixa de concentrações utilizadas no experimento). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

A atividade moduladora do OELaIII sobre CET foi de 70,83% de efeitos sinérgicos, 8,33% de efeitos indiferentes e 20,84% de efeitos de antagonísticos.

Gráfico 25 – Isobolograma mostrando o efeito das associações OELaIII-CET, na inibição do crescimento de cepas de *Candida*



Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido.

Fonte: O autor (2022).

Tabela 9 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Miconazol (MIC) sobre cepas de *Candida*

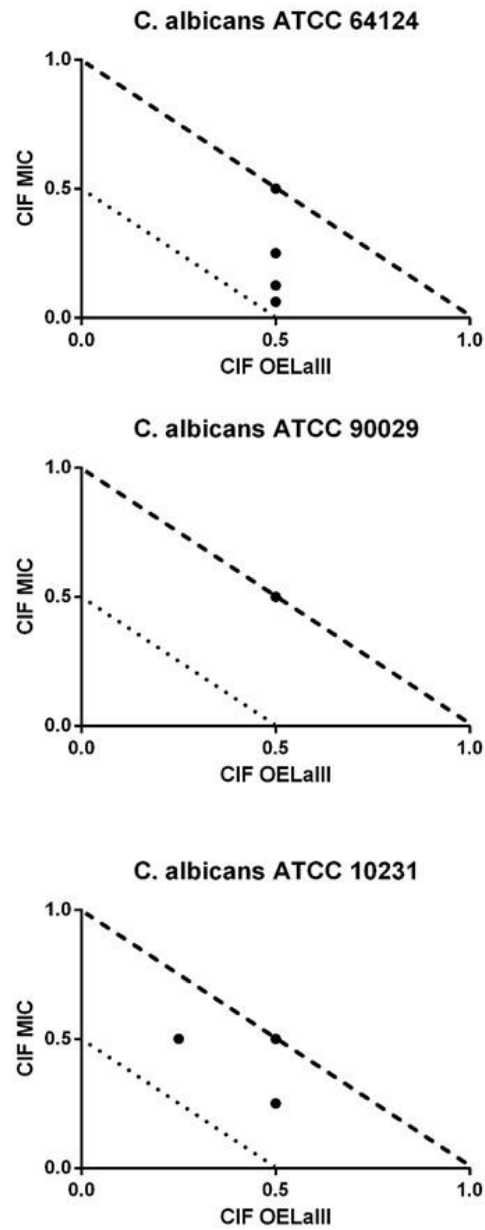
Microrganismo	CIM _{OELaIII}		CIF _{OELaIII}	CIM _{MIC}		CIF _{MIC}	ICIF	Efeito
	I	A		I	A			
<i>C. albicans</i>	0,078	0,039	0,5	10	5	0,5	1	Antagonismo
ATCC 64124	0,078	0,039	0,5	10	2,5	0,25	0,75	Indiferente
	0,078	0,039	0,5	10	1,25	0,125	0,625	Indiferente
	0,078	0,039	0,5	10	0,625	0,062	0,562	Indiferente
<i>C. albicans</i>	0,312	0,156	0,5	0,078	0,039	0,5	1	Antagonismo
ATCC 90029	0,625	0,312	0,5	0,625	0,312	0,5	1	Antagonismo
<i>C. albicans</i>	0,625	0,312	0,5	0,625	0,156	0,25	0,75	Indiferente
ATCC 10231	0,625	0,156	0,25	0,625	0,312	0,5	0,75	Indiferente

CIM_{OELaIII}: CIM do OELaIII (mg/mL); CIM_{MIC}: CIM do MIC (µg/mL). I: OELaIII ou MIC isolados; A: associação OELaIII-MIC. CIF_{OELaIII} = CIM do OELaIII na associação/CIM do OELaIII isolado. CIF_{MIC} = CIM do MIC na associação/CIM do MIC isolado. Índice CIF = CIF_{OELaIII} + CIF_{MIC}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF >0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003). – (Não determinada para a faixa de concentrações utilizadas no experimento). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

Para as associações OELaIII-MIC observamos apenas a presença de efeitos aditivos (62,5%) e antagônicos (37,5%).

Gráfico 26 – Isoblograma mostrando o efeito das associações OELaIII-MIC, na inibição do crescimento de cepas de *Candida*



Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido
 Fonte: O autor (2022).

Tabela 10 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Clotrimazol (CLO) sobre cepas de Candida

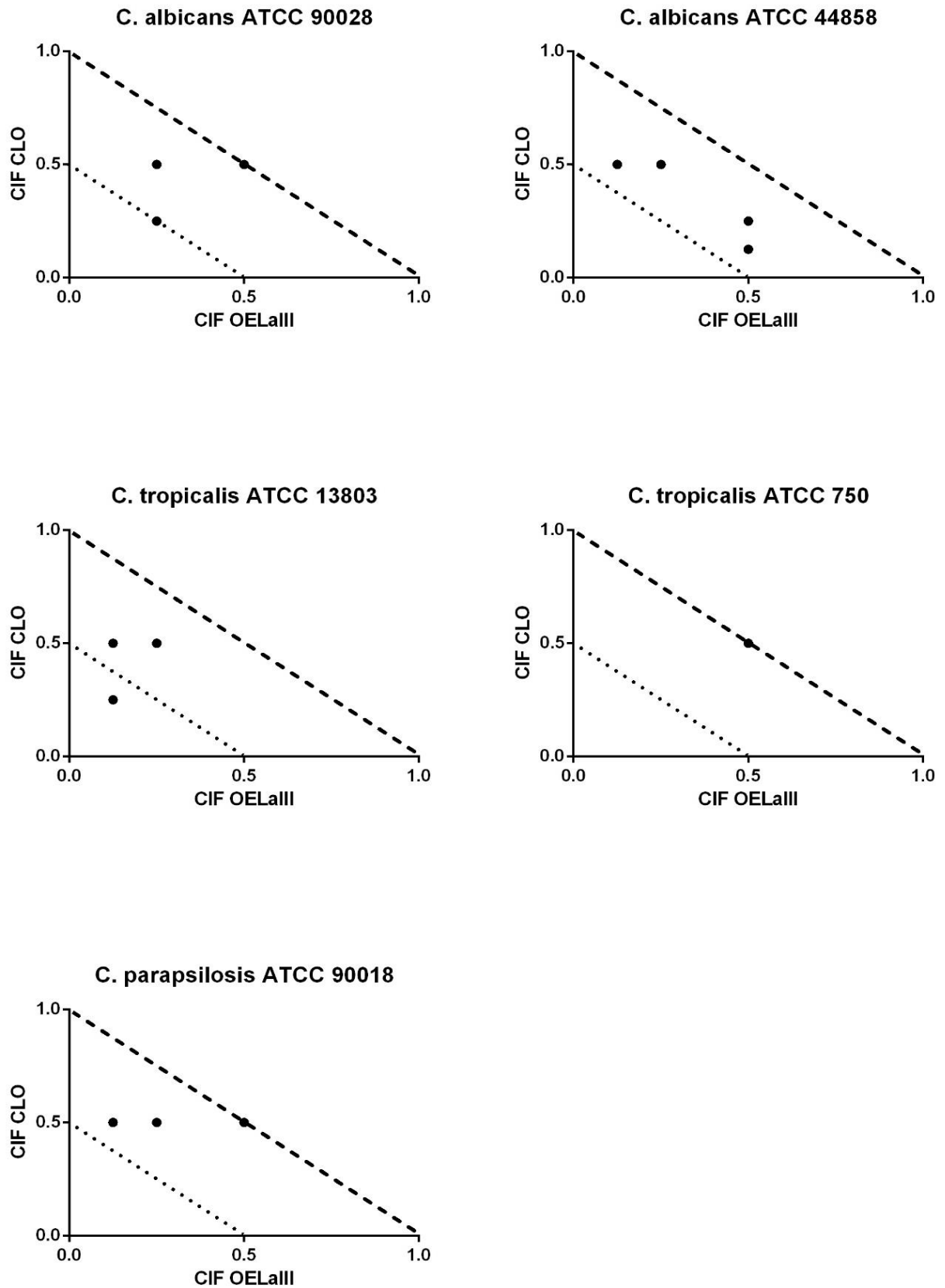
Microrganismo	CIM _{OELaIII}		CIF _{OELaIII}	CIM _{CLO}		CIF _{CLO}	ICIF	Efeito
	I	A		I	A			
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,625	0,312	0,5	0,312	0,156	0,5	1	Antagonismo
	0,625	0,156	0,25	0,312	0,156	0,5	0,75	Indiferente
	0,625	0,156	0,25	0,312	0,078	0,25	0,5	Sinergismo
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	0,625	0,156	0,25	0,156	0,078	0,5	0,75	Indiferente
	0,625	0,078	0,125	0,156	0,078	0,5	0,625	Indiferente
	0,625	0,312	0,5	0,156	0,039	0,25	0,75	Indiferente
	0,625	0,312	0,5	0,156	0,019	0,125	0,625	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	0,312	0,25	5	2,5	0,5	0,75	Indiferente
	1,25	0,156	0,125	5	2,5	0,5	0,625	Indiferente
	1,25	0,156	0,125	5	1,25	0,25	0,375	Sinergismo
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,625	0,312	0,5	0,312	0,156	0,5	1	Antagonismo
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0,156	0,078	0,5	0,078	0,039	0,5	1	Antagonismo
	0,156	0,039	0,25	0,078	0,039	0,5	0,75	Indiferente
	0,156	0,019	0,125	0,078	0,039	0,5	0,625	Indiferente

CIM_{OELaIII}: CIM do OELaIII (mg/mL); CIM_{CLO}: CIM do CLO (µg/mL). I: OELaIII ou CLO isolados; A: associação OELaIII-CLO. CIF_{OELaIII} = CIM do OELaIII na associação/CIM do OELaIII isolado. CIF_{CLO} = CIM do CLO na associação/CIM do CLO isolado. Índice CIF = CIF_{OELaIII} + CIF_{CLO}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003). – (Não determinada para a faixa de concentrações utilizadas no experimento). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

A atividade moduladora do OELaIII sobre o antifúngico Clotrimazol (CLO) resultou em 14,13% de efeitos sinérgicos, 64,28% de efeitos indiferentes e 21,42% de efeitos de antagonismos.

Gráfico 27 – Isobologramas mostrando o efeito das associações OELaIII-CLO na inibição do crescimento de cepas de *Candida*



Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido
 Fonte: O autor (2022).

Tabela 11 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Ciclopirox-olamina (CIC) sobre cepas de *Candida*

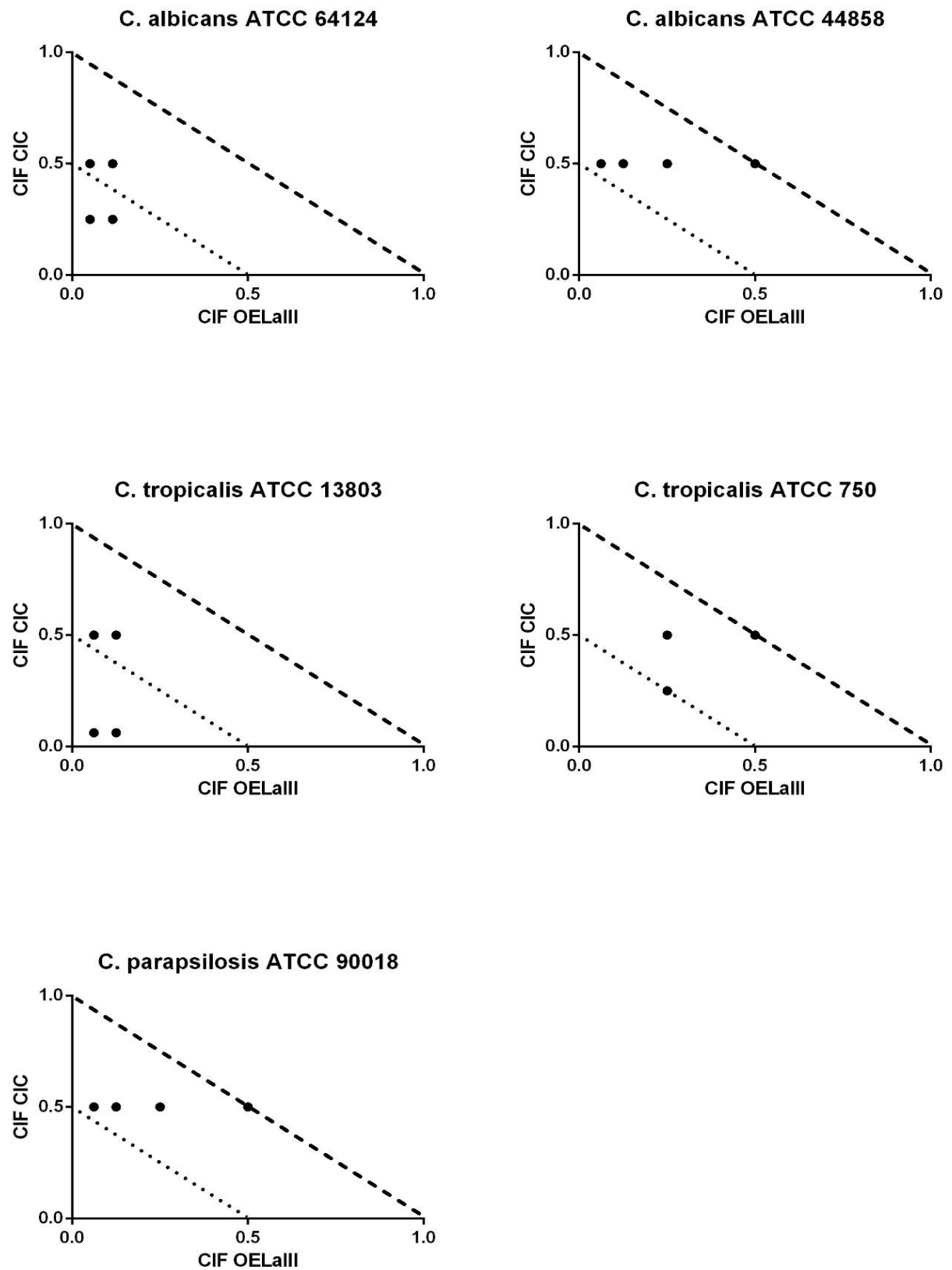
Microrganismo	CIM _{OELaIII}		CIF _{OELaIII}	CIM _{CIC}		CIF _{CIC}	ICIF	Efeito
	I	A		I	A			
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,078	0,009	0,115	0,078	0,039	0,5	0,615	Indiferente
	0,078	0,004	0,051	0,078	0,039	0,5	0,551	Indiferente
	0,078	0,009	0,115	0,078	0,019	0,25	0,365	Sinergismo
	0,078	0,004	0,051	0,078	0,019	0,25	0,301	Sinergismo
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	0,625	0,312	0,5	0,156	0,078	0,5	1	Antagonismo
	0,625	0,156	0,25	0,156	0,078	0,5	0,75	Indiferente
	0,625	0,078	0,125	0,156	0,078	0,5	0,625	Indiferente
	0,625	0,039	0,062	0,156	0,078	0,5	0,562	Indiferente
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	0,156	0,125	5	2,5	0,5	0,625	Indiferente
	1,25	0,078	0,062	5	2,5	0,5	0,562	Indiferente
	1,25	0,625	0,125	5	0,312	0,062	0,187	Sinergismo
	1,25	0,625	0,062	5	0,312	0,062	0,124	Sinergismo
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,625	0,312	0,5	0,312	0,156	0,5	1	Antagonismo
	0,625	0,312	0,25	0,312	0,078	0,25	0,5	Sinergismo
	0,625	0,156	0,25	0,312	0,156	0,5	0,75	Indiferente
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0,156	0,078	0,5	0,078	0,039	0,5	1	Antagonismo
	0,156	0,039	0,25	0,078	0,039	0,5	0,75	Indiferente
	0,156	0,019	0,125	0,078	0,039	0,5	0,625	Indiferente
	0,156	0,009	0,062	0,078	0,039	0,5	0,562	Indiferente

CIM_{OELaIII}: CIM do OELaIII (mg/mL); CIM_{CIC}: CIM do CIC (µg/mL). I: OELaIII ou CIC isolados; A: associação OELaIII-CIC. CIF_{OELaIII} = CIM do OELaIII na associação/CIM do OELaIII isolado. CIF_{CIC} = CIM do CIC na associação/CIM do CIC isolado. Índice CIF = CIF_{OELaIII} + CIF_{CIC}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003). – (Não determinada para a faixa de concentrações utilizadas no experimento). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

As associações OELaIII-CIC inibiram o crescimento de cinco das oito cepas testadas, com uma predominância de efeitos indiferentes (63,15%).

Gráfico 28 – Isobologramas mostrando o efeito das associações OELaIII-CIC, na inibição do crescimento de cepas de *Candida*



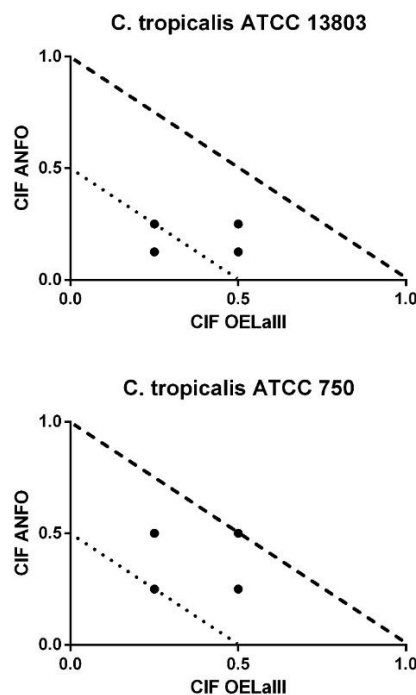
Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido
 Fonte: O autor (2022).

Tabela 12 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica da Anfotericina B (ANFO) sobre cepas de *Candida*

Microrganismo	CIM _{OELaIII}		CIF _{OELaIII}	CIM _{ANFO}		CIF _{ANFO}	ICIF	Efeito
	I	A		I	A			
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	0,625	0,5	10	2,5	0,25	0,75	Indiferente
	1,25	0,625	0,5	10	1,25	0,125	0,625	Indiferente
	1,25	0,312	0,25	10	2,5	0,25	0,5	Sinergismo
	1,25	0,312	0,25	10	1,25	0,125	0,375	Sinergismo
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,625	0,312	0,5	5	2,5	0,5	1	Antagonismo
	0,625	0,312	0,5	5	1,25	0,25	0,75	Indiferente
	0,625	0,156	0,25	5	2,5	0,5	0,75	Indiferente
	0,625	0,156	0,25	5	1,25	0,25	0,5	Sinergismo

CIM_{OELaIII}: CIM do OELaIII (mg/mL); CIM_{ANFO}: CIM do ANFO (µg/mL). I: OELaIII ou ANFO isolados; A: associação OELaIII-ANFO. CIF_{OELaIII} = CIM do OELaIII na associação/CIM do OELaIII isolado. CIF_{ANFO} = CIM do ANFO na associação/CIM do ANFO isolado. Índice CIF = CIF_{OELaIII} + CIF_{ANFO}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF > 0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003). – (Concentração não determinada para a faixa de concentrações utilizadas no experimento). Experimento realizado em triplicata, em três repetições. Fonte: O autor (2022).

As associações OELaIII-ANFO inibiram apenas duas cepas, com 37,5% de efeitos sinérgicos, 50% de efeitos indiferentes e 12,5% de efeitos de antagonísticos.

Gráfico 29 – Isobologramas mostrando o efeito das associações OELaIII-ANFO, na inibição do crescimento de cepas de *Candida*

Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido

Fonte: O autor (2022).

Tabela 13 – Efeito modulador do OELaIII na atividade antifúngica do Fluconazol (FLU) sobre cepas de Candida

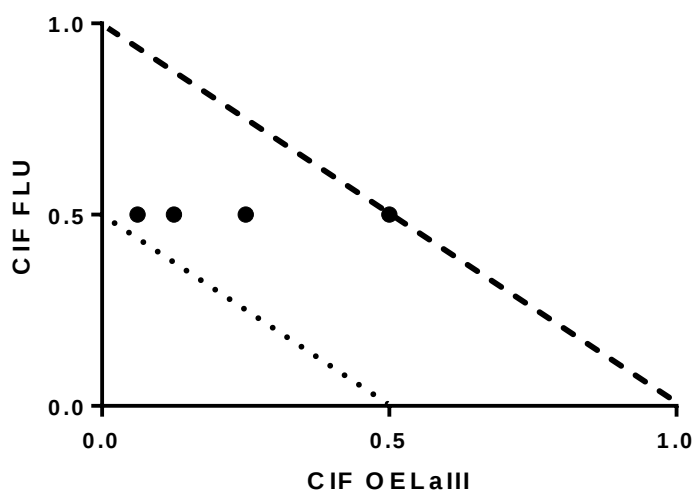
Microrganismo	CIM _{OELaIII}		CIF _{OELaIII}	CIM _{FLU}		CIF _{FLU}	ICIF	
	I	A		I	A			
C. parapsilosis	0,156	0,078	0,5	0,078	0,039	0,5	1	Antagonismo
ATCC 90018	0,156	0,039	0,25	0,078	0,039	0,5	0,75	Indiferente
	0,156	0,019	0,125	0,078	0,039	0,5	0,625	Indiferente
	0,156	0,009	0,062	0,078	0,039	0,5	0,562	Indiferente

CIM_{OELaIII}: CIM do OELaIII (mg/mL); CIM_{FLU}: CIM do FLU (µg/mL). I: OELaIII ou FLU isolados; A: associação OELaIII-FLU. CIF_{OELaIII} = CIM do OELaIII na associação/CIM do OELaIII isolado. CIF_{FLU} = CIM do ANFO na associação/CIM do ANFO isolado. Índice CIF = CIF_{OELaIII} + CIF_{FLU}. ICIF ≤ 0,5: sinergismo; ICIF >0,5 e < 1,0: aditivo ou indiferente; ICIF ≥ 1,0: antagonismo (Eucast, 2003). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

A atividade modulatória do OELaIII sobre o antifúngico Fluconazol (FLU) revelou a presença de 0% de efeitos sinérgicos, 75% de efeitos indiferentes e 25% de efeitos de antagonismos.

Gráfico 30 – Isoblograma mostrando o efeito das associações OELaIII-FLU, na inibição do crescimento da cepa C. parapsilosis ATCC 90018



Os pontos representam os valores de CIF de associações em que o crescimento microbiano foi inibido

Fonte: O autor (2022).

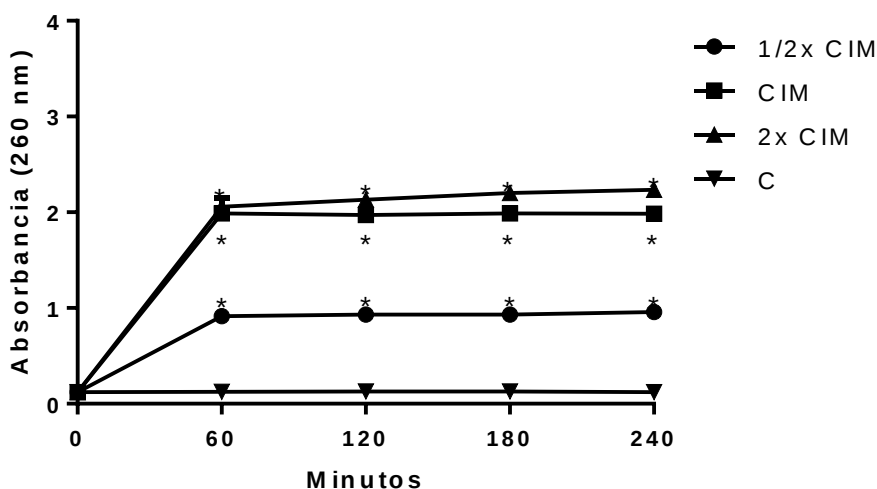
7.2.7 Ensaios de mecanismo de ação

7.2.7.1 Ocorrência de alteração na permeabilidade do envoltório celular

7.2.7.1.1 Liberação de material genético

A liberação de ácidos nucleicos pelas cepas de referência de *Candida* expostas a 1/2x CIM, CIM, 2x CIM de OELaIII pode ser visualizada nos gráficos 31 a 38, onde os valores são expressos em densidade óptica (DO) a 260 nm, obtida após 0, 60, 120, 180 e 240 minutos de exposição a 1/2x CIM, CIM e 2x CIM de OELaIII. As concentrações de OELaIII usadas foram capazes de promover um aumento na perda de material genético em todas as cepas testadas (Gráficos 31 a 38).

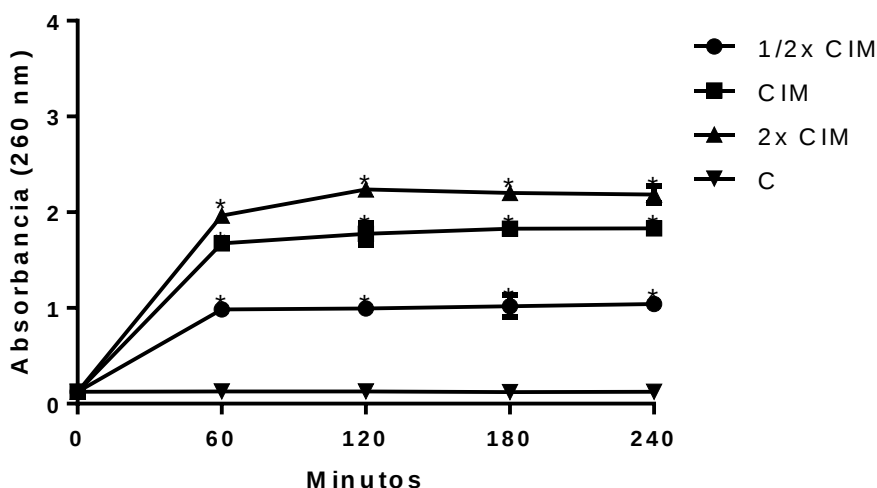
Gráfico 31 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. albicans* ATCC 10231 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL), CIM (0,625 mg/mL), 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle sem tratamento).

Fonte: O autor (2022).

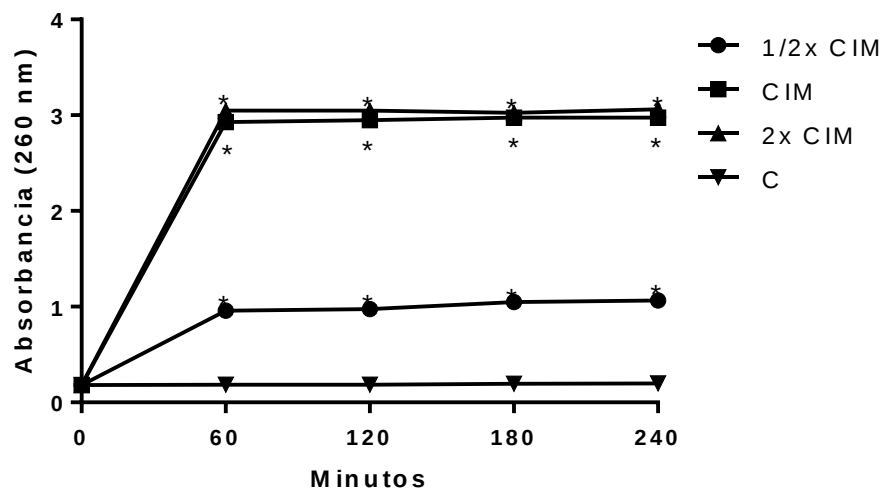
Gráfico 32 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. albicans* ATCC 90029 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com

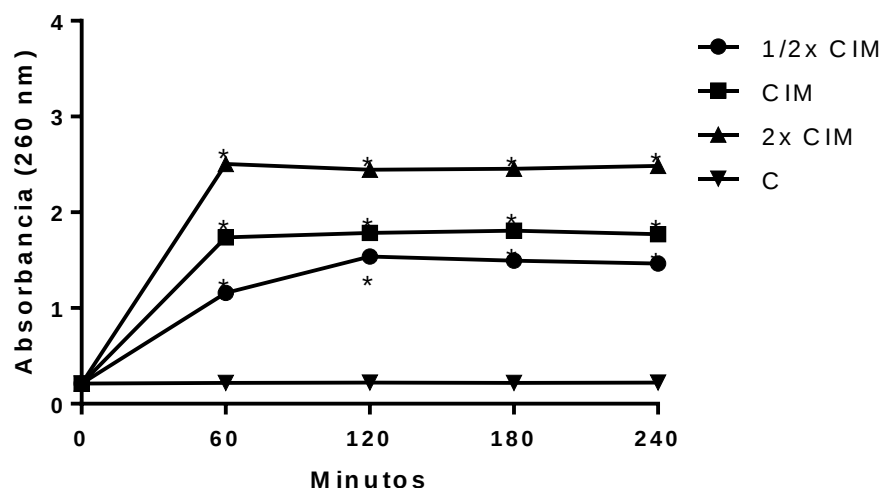
$p < 0,05$. 2x CIM (0,625 mg/mL). CIM (0,312mg/mL). 1/2x CIM (0,156 mg/mL). C (Controle).
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 33 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. albicans* ATCC 90028 exposta a OELaIII



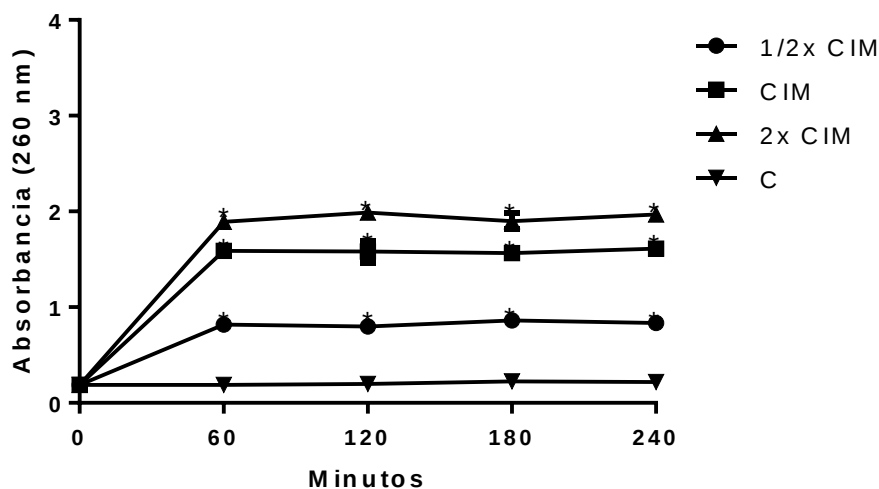
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL). CIM (0,625mg/mL). 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle).
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 34 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. parapsilosis* ATCC 90018 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (0,312 mg/mL). CIM (0,156 mg/mL). 1/2x CIM (0,078 mg/mL). C (Controle).
Fonte: O autor (2022).

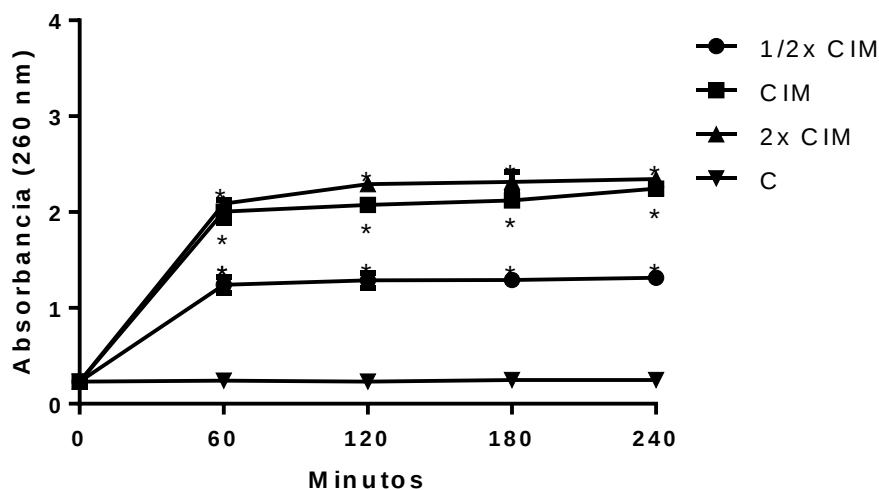
Gráfico 35 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. albicans* ATCC 64124 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (0,156 mg/mL). CIM (0,078 mg/mL). 1/2x CIM (0,039 mg/mL). C (Controle).

Fonte: O autor (2022).

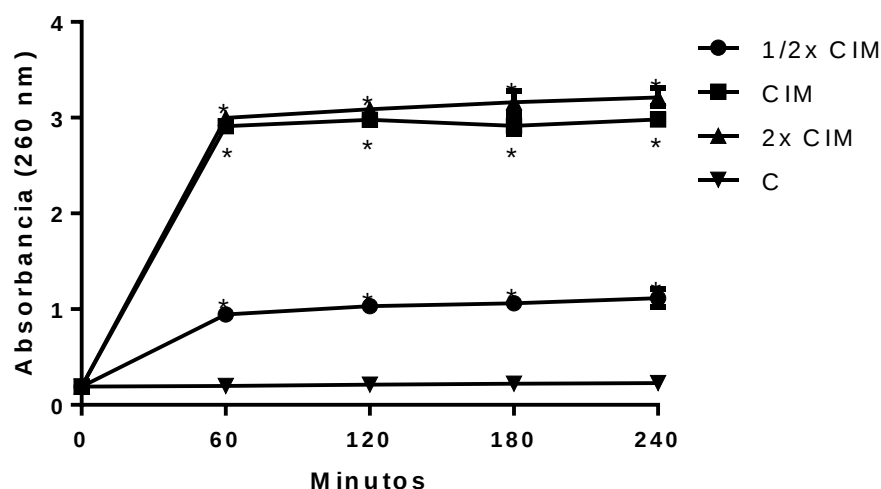
Gráfico 36 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. albicans* ATCC 44858 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL). CIM (0,625 mg/mL). 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle).

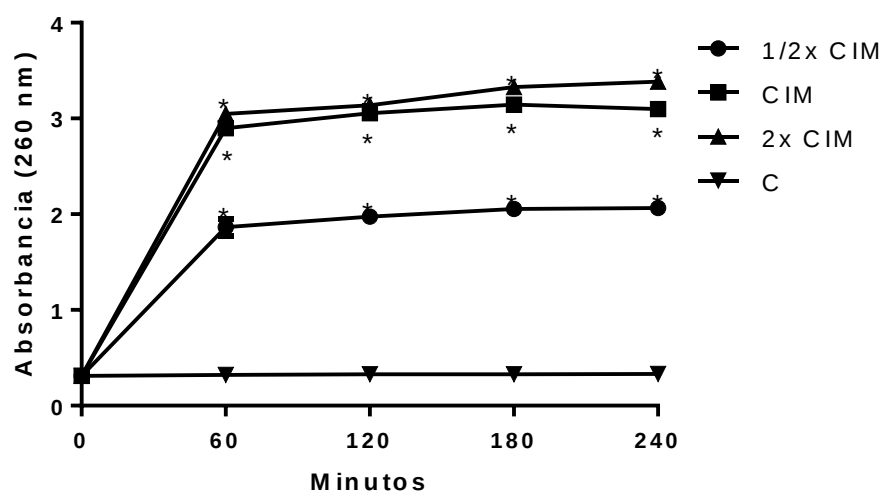
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 37 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. tropicalis* ATCC 750 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL). CIM (0,625 mg/mL). 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle).
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 38 – Liberação de ácidos nucleicos pela cepa *C. tropicalis* ATCC 13803 exposta a OELaIII



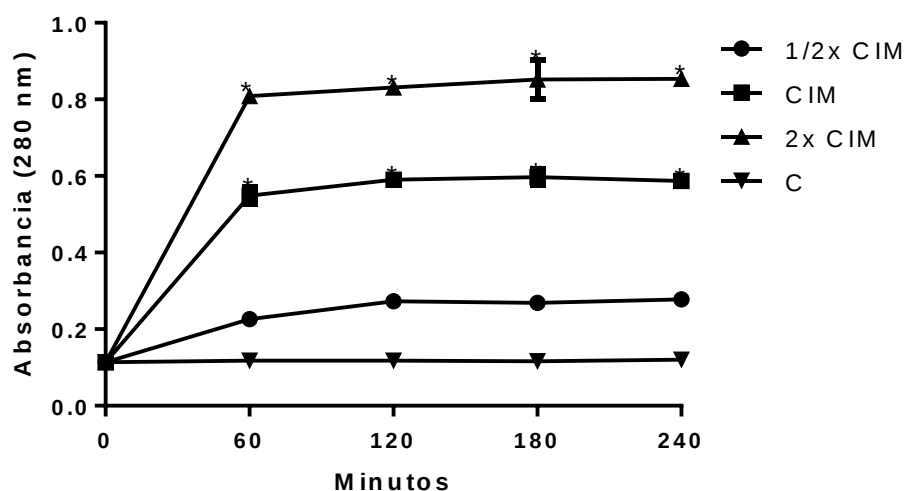
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (2,5 mg/mL). CIM (1,25 mg/mL). 1/2x CIM (0,625 mg/mL). C (Controle).
Fonte: O autor (2022).

7.2.7.1.2 Liberação de proteínas

A liberação de proteínas pelas cepas de referência de *Candida* expostas a 1/2x CIM, CIM, 2x CIM de OELaIII podem ser visualizadas nos gráficos, onde os valores são expressos

em densidade óptica (DO) a 280 nm, nos tempos 0, 60, 120, 180 e 240 minutos. 1/2x CIM, CIM e 2x CIM de OELaIII foram capazes de promover um aumento na liberação de proteínas em todas as cepas testadas (Gráficos 39-46).

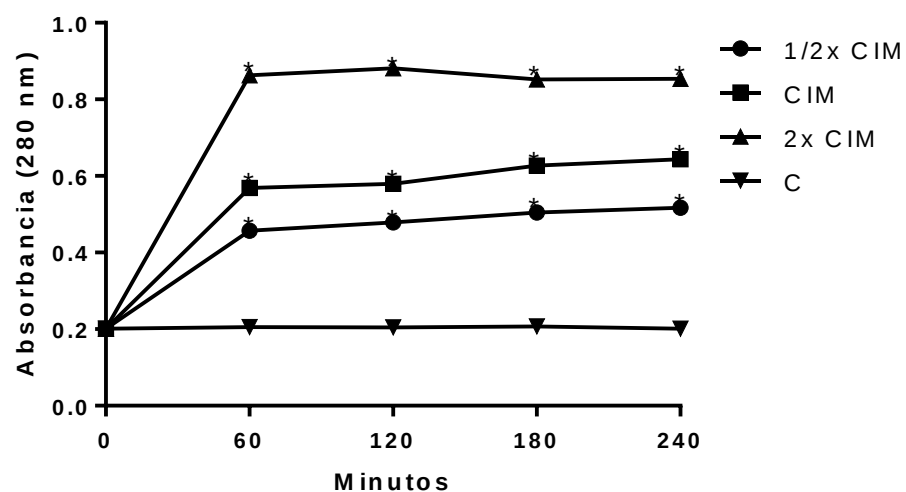
Gráfico 39 – Liberação de proteínas pela cepa *C. albicans* ATCC 10231 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL). CIM (0,625 mg/mL). 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle sem tratamento).

Fonte: O autor (2022).

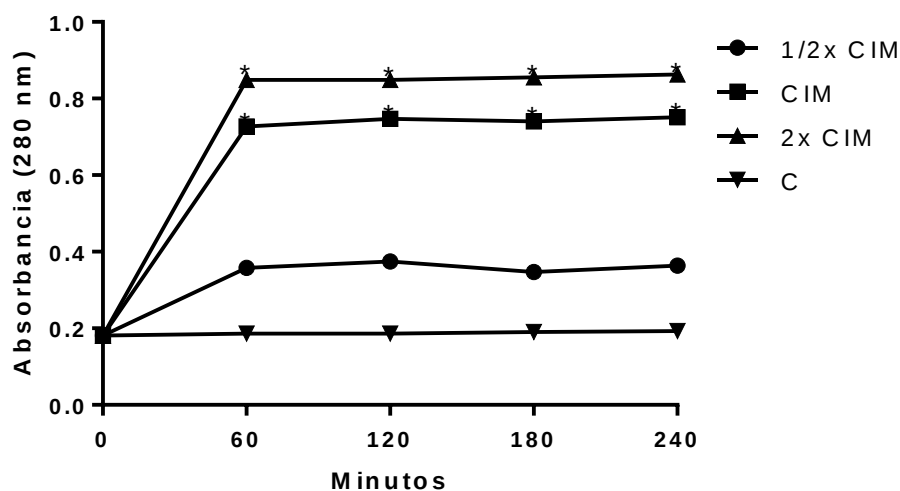
Gráfico 40 – Liberação de proteínas pela cepa *C. albicans* ATCC 90029 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (0,625 mg/mL). CIM (0,312mg/mL). 1/2x CIM (0,156 mg/mL). C (Controle).

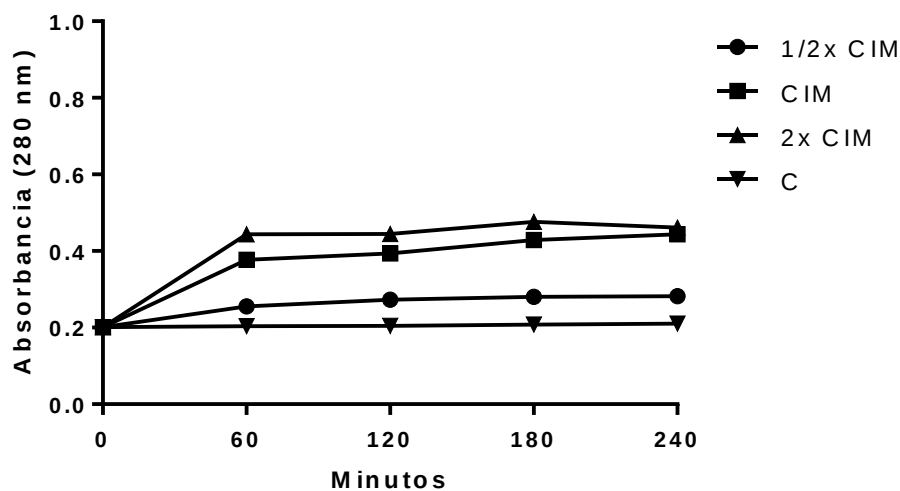
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 41 – Liberação de proteínas pela cepa *C. albicans* ATCC 90028 exposta a OELaIII



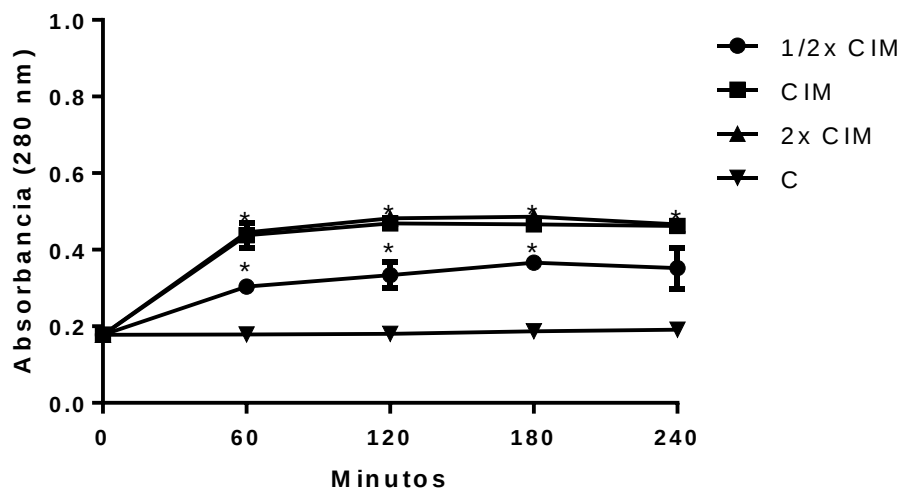
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL). CIM (0,625mg/mL). 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle). Fonte: O autor (2022).

Gráfico 42 – Liberação de proteínas pela cepa *C. parapsilosis* ATCC 90018 exposta a OELaIII



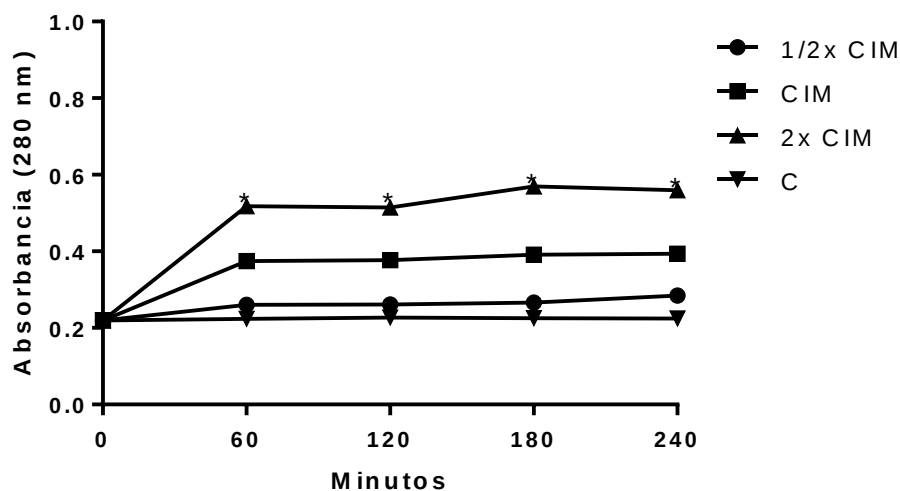
Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (0,312 mg/mL). CIM (0,156 mg/mL). 1/2x CIM (0,078 mg/mL). C (Controle). Fonte: O autor (2022).

Gráfico 43 – Liberação de proteínas pela cepa *C. albicans* ATCC 64124 exposta a OELaIII

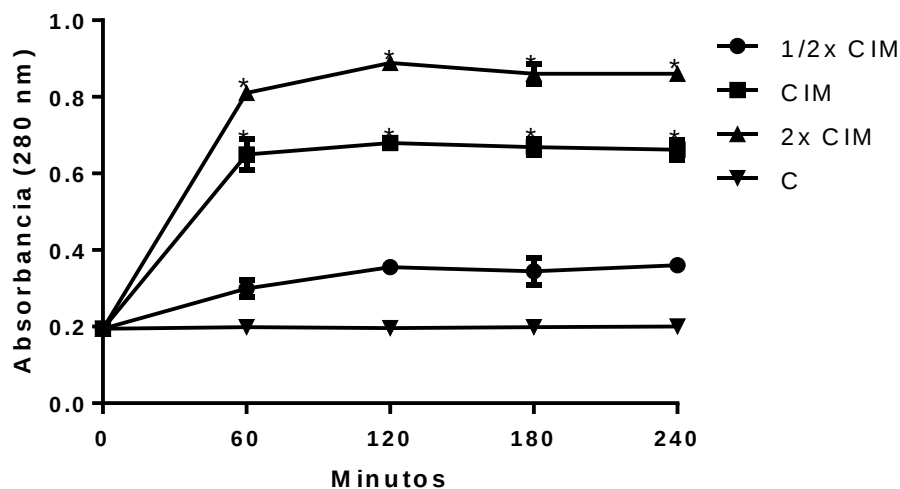


Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (0,156 mg/mL). CIM (0,078 mg/mL). 1/2x CIM (0,039 mg/mL). C (Controle). Fonte: O autor (2022).

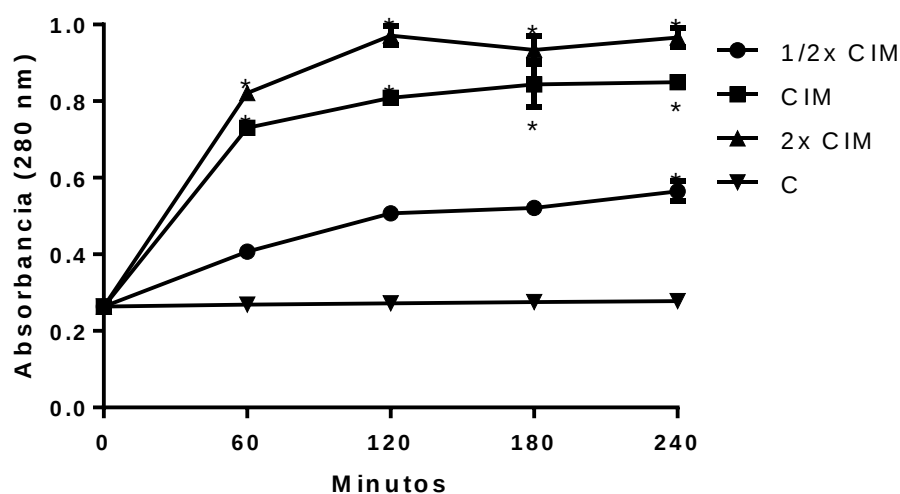
Gráfico 44 – Liberação de proteínas pela cepa *C. albicans* ATCC 44858 exposta a OELaIII



Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL). CIM (0,625 mg/mL). 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle). Fonte: O autor (2022).

Gráfico 45 – Liberação de proteínas pela cepa *C. tropicalis* ATCC 750 exposta a OELaIII

Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (1,25 mg/mL). CIM (0,625 mg/mL). 1/2x CIM (0,312 mg/mL). C (Controle).
Fonte: O autor (2022).

Gráfico 46 – Liberação de proteínas pela cepa *C. tropicalis* ATCC 13803 exposta a OELaIII

Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. A análise dos dados foi realizada por ANOVA, com pós-teste de Tukey com $p < 0,05$. 2x CIM (2,5 mg/mL). CIM (1,25 mg/mL). 1/2x CIM (0,625 mg/mL). C (Controle).
Fonte: O autor (2022).

7.2.7.1.3 Mecanismo de ação do sorbitol

Observamos que o potencial antifúngico do OELaIII foi reduzido na presença do sorbitol (aumento dos valores de CIM do OELaIII em 2 a 16x). Como o sorbitol é um protetor

osmótico, impediu o OELaIII de causar a lise da levedura, sugerindo assim, que seu mecanismo de ação está envolvido com o rompimento da parede celular (Tabela 14).

Tabela 14 – Ação do sorbitol na atividade antifúngica do OELaIII

	Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)	
	OELaIII	OELaIII + Sorbitol
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,625	1,25
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,625	1,25
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	0,312	1,25
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,078	0,625
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	0,625	2,5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0,156	2,5
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,625	1,25
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	1,25	5

Controle: Tween 80 a 1%; Miconazol (Miconazol 20 µg/mL) e Sorbitol 0,8M. A CIM foi considerada a menor concentração de OELaIII ou OELaIII+sorbitol, capaz de inibir o crescimento das cepas de *Candida*, com ausência de turvação visível. Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

7.2.7.1.4 Ensaio do mecanismo de ação do ergosterol

Observamos que a atividade antifúngica do OELaIII foi reduzida na presença do ergosterol, com valores de CIM aumentados em 4 a 64x, indicando que o mecanismo de ação do OELaIII pode estar associado ao rompimento da membrana celular (Tabela 15).

Tabela 15 – Ação do Ergosterol na atividade antifúngica do OELaIII

	Concentração Inibitória Mínima (mg/mL)		
	OELa	OELaIII + Ergosterol	OELaIII + Ergosterol
	III	100 µg/mL	200 µg/mL
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,625	1,25	5
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	0,625	2,5	5
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	0,312	2,5	5
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	0,078	0,625	5
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	0,625	2,5	5
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	0,156	1,25	5
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0,625	1,25	5

***C. tropicalis* ATCC 13803** 1,25 5 5

Controle: DMSO a 1% e Miconazol (Miconazol 20 µg/mL). A CIM foi considerada a menor concentração de OELaIII, capaz de inibir o crescimento das cepas de *Candida*, com ausência de turvação visível. Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

7.2.7.2 Efeito de concentrações do OELaIII na atividade de fatores de virulência microbiana de cepas de *Candida*

7.2.7.2.1 Atividade proteinase

Observamos nos resultados que somente as cepas *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 90018 e *C. tropicalis* ATCC 750 são produtoras de proteinase. A tabela apresenta o efeito da exposição a concentrações de OELaIII sobre a expressão da proteinase pelas cepas de *Candida*. O OELaIII inibiu a ação da enzima na cepa *C. tropicalis* ATCC 750, nas concentrações de 1/2 (0,312 mg/mL) e 1/4 (0,156 mg/mL) da CIM (Tabela 16).

Tabela 16 – Efeito de concentrações sub-inibitórias do OELaIII sobre a atividade proteinase de cepas de *Candida*

	Atividade da proteinase				
	Concentrações do OELaIII (mg/mL)				C
	1/2 CIM	1/4 CIM	1/8 CIM	1/16 CIM	
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	++	++	++	++	++
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	+	+	++	++	++
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	-	-	-	-	-

Atividade da proteinase: muito alta (++++; AP de 0,69 ou inferior); alta (+++; AP de 0,70-0,79), baixa (++; AP de 0,80-0,89); muito baixa (+; AP de 0,90 ou superior); não produtora de proteinase (-). Controle (C). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

7.2.7.2.2 Atividade fosfolipase

Observamos nos resultados que somente as cepas *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028 são produtoras de fosfolipase. A tabela apresenta o efeito da exposição a concentrações de OELaIII sobre a expressão da fosfolipase pelas cepas de *Candida*. A

expressão da atividade da fosfolipase das cepas testadas não foi inibida pela exposição a concentrações do OELaIII (Tabela 17).

Tabela 17 – Efeito de concentrações sub-inibitórias do OELaIII sobre a atividade fosfolipase de cepas de *Candida*

	Atividade da fosfolipase				
	Concentrações do OELaIII (mg/mL)				
	1/2 CIM	1/4 CIM	1/8 CIM	1/16 CIM	C
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	+	+	+	+	+
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	++++	++++	+++	+++	+++
<i>C. albicans</i> ATCC 90029	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 64124	-	-	-	-	-
<i>C. albicans</i> ATCC 44858	-	-	-	-	-
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 90018	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	-	-	-	-	-
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	-	-	-	-	-

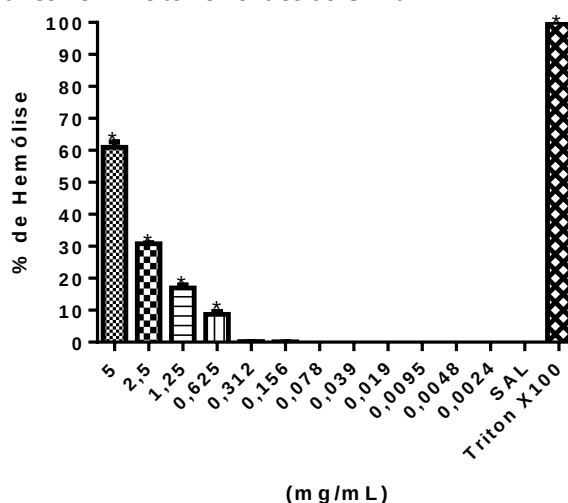
Atividade da fosfolipase: muito alta (++++; AP de 0,69 ou inferior); alta (+++; AP de 0,70-0,79), baixa (++; AP de 0,80-0,89); muito baixa (+; AP de 0,90 ou superior); não produtora de fosfolipase (-). Controle (C). Experimento realizado em triplicata, em três repetições.

Fonte: O autor (2022).

7.2.8 Atividade hemolítica do OELaIII.

Diferentes concentrações do OELaIII (5 a 0,02 mg/mL) foram testadas para avaliar seu efeito hemolítico em eritrócitos de carneiro desfibrinados em PBS (pH 7,4). Neste experimento, fixou-se a concentração de eritrócitos (Ht-2,0%) para avaliação da liberação de hemoglobina com efeito hemolítico do OELaIII - IC₅₀: 2,42 mg/mL (Gráfico 47).

Gráfico 18 – Efeito hemolítico do OELaIII



Controles: Triton X 100 (Hemólise total); SAL (suspensão de hemácias). Os valores representam a média $\pm$ EPM. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle SAL.

Fonte: O autor (2022).

8 DISCUSSÃO

No presente estudo foi avaliada a atividade antifúngica do óleo essencial do quimiotipo III (limonemo e carvona) de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (OELaIII) extraído das folhas da “erva-cidreira”, com determinação da CIM, da CLM, CIMB, CMEB, do efeito do tempo de exposição na viabilidade microbiana, o efeito modulador na eficiência de antifúngicos de uso clínico, na interferência na atividade de fatores de virulência microbianos, seu mecanismo de ação, além da determinação de sua atividade hemolítica.

O OELaIII foi obtido por hidrodestilação (CRAVEIRO, 1981) com rendimento de 0,38% e apresentou-se como um óleo de cor verde amarelado com um odor bastante cítrico. Castro et al (2001), observaram rendimentos médios na extração dos óleos essenciais de *Lippia alba* variando de 0,15% a 0,47%.

A variabilidade na composição química do óleo essencial de *L. alba* é comprovada em vários trabalhos, e levou a classificação dos quimiotipos, que são organizados de acordo com a presença de determinados componentes majoritários na composição, sendo um fator determinante para as diferentes atividades farmacológicas (GOMES *et al.*, 1993; MATOS, 1996; CASTRO *et al.*, 2001; JULIÃO *et al.*, 2003).

Mamun-Or-Rashid et al. (2013), descreveram pelo menos 12 quimiotipos de *Lippia* de acordo com os principais componentes químicos: citral, linalol, carvona, limoneno, γ -terpineno, citral-mirceno, citral-limoneno, citral-cariofileno, citral-germacreno D, carvona-limoneno, 1,8-cineol-cânfora, 1,8-cineol-limoneno e limoneno-piperitona.

A caracterização química do OELaIII identificou 11 diferentes constituintes, todos da classe dos terpenos, sendo o limonemo (25,37%) e a carvona (58,15%) os constituintes majoritários (Tabela 1; Figura1).

Matos (1996), classificou os quimiotipos de *Lippia alba* em: tipo I (mirceno e citral); tipo II (limoneno e citral); tipo III (limoneno e carvona), o que de acordo com os dados encontrados no presente estudo, sugerem que o óleo essencial das folhas de *L. alba* pode ser classificado em quimiotipo III – com carvona e limoneno e ausência de citral.

Porfirio et al. (2017) avaliando a atividade antimicrobiana de *L. alba* coletada em municípios do Ceará, identificaram três quimiotipos baseados em sua composição química. Um dos quimiotipos, o LA3, apresentou 13 componentes, com compostos majoritários: carvona (71,54%), limoneno (5,25%) e geranial (4,66%). Apesar das diferentes classificações para o quimiotipos de *L. alba*, o quimiotipo LA3 difere do nosso quimiotipo III, pela presença do

geranial, pois Matos (1996) classificou o quimiotipo III de acordo com presença majoritária da carvona e do limoneno, sem a presença de geranial.

Os óleos essenciais podem inibir o crescimento de fungos temporariamente (fungistáticos) ou permanentemente (fungicida) dependendo do seu mecanismo de ação. Entre os compostos presentes nos óleos essenciais, os terpenos apresentam um mecanismo de atividade antimicrobiana ainda não totalmente elucidado, entretanto, seu caráter lipofílico pode levar ao acúmulo nas membranas, com consequente perda de energia pelas células (KHAMENEH *et al.*, 2019).

Porfirio *et al.* (2017) sugeriram que o mecanismo de ação do terpenóide carvona envolve a desestabilização estrutural dos fosfolipídios e interação com as proteínas da membrana, além de atuar como trocador de prótons, alterando o gradiente de pH através da membrana.

Já o limoneno, outro componente terpeno importante do OELaIII, inibiu o crescimento de *C. albicans* ao causar stress oxidativo no envoltório celular, levando também a danos no DNA, resultando na modulação do ciclo celular e na indução de apoptose através do stress nucleolar (THAKRE *et al.*, 2018).

Sharma e Tripathi (2008) demonstraram que a atividade antifúngica dos óleos essenciais pode ser avaliada de forma mais eficaz em meios líquidos, do que semissólidos ou sólidos, já que, no último, a difusão de óleo pode acontecer de forma não apropriada.

No estudo da determinação da CIM e CLM do OELaIII, foram utilizados os métodos padrão de microdiluição para a avaliação da susceptibilidade antifúngica, pois estas metodologias permitem a utilização de uma quantidade reduzida de óleo, a avaliação concomitante de várias amostras, bem como a reprodutibilidade dos dados.

Os valores de CIM do OELaIII variaram de 1,25 mg/mL a 0,078 mg/mL, para as cepas de *Candida* utilizadas no presente estudo (Tabela 2). Em relação a CLM, o OELaIII foi capaz de inviabilizar as cepas de *Candida* nas mesmas concentrações encontradas para cada respectiva CIM (Gráficos 1-8).

Sartoratto *et al.* (2004) sugeriram uma classificação para materiais vegetais baseada em valores de concentração inibitória mínima, onde: inibidores fortes, possuem CIM até 0,5 mg/mL, inibidores moderados, possuem CIM entre 0,6 e 1,5 mg/mL e inibidores fracos, apresentam CIM acima de 1,6 mg/mL, desta forma, o OELaIII pode ser classificado como um inibidor moderado a forte, dependendo da cepa testada.

No presente estudo, OELaIII demonstrou efeito antifúngico contra oito cepas de *Candida*, com CIM variando de 0,078 mg/mL a 1,25 mg/mL, com valores semelhantes aos de

CLM. Isto demonstra que o OELaIII tem efeitos antifúngicos classificados de fortes a fracos, dependendo da estirpe testada, segundo a classificação de Sartoratto (2004).

A atividade antimicrobiana e antifúngica do óleo essencial dos quimiotipos de *L. alba* é relatada em vários estudos, entre eles o quimiotipo carvona, que apresenta uma boa atividade inibitória para diversos microrganismos, em particular contra cepas Gram-positivo de isolados clínicos humanos (HENNEBELLE *et al.*, 2008; JARAMILLO-COLORADO *et al.*, 2012).

Em estudos anteriores, o óleo de *L. alba* mostrou efeito antifúngico contra o fungo fitopatogênico *Pleurotus ostreatus*, responsável pela podridão branca em diversas culturas, quando a concentração utilizada foi superior a 1,0 mL/L (GEROMINI *et al.*, 2015).

Os valores de CIM para os antifúngicos foram determinados em nosso estudo, pelo método de microdiluição em caldo de cultura. As CIM's encontradas, variaram de acordo com cada cepa: Cetoconazol (40 a 0,078 µg/mL), Miconazol (10 a 0,078 µg/mL), Nistatina (20 a 5µg/mL), Clotrimazol (5 a 0,078 µg/mL), Fluconazol (5 a 0,312 µg/mL), Ciclopirox olamina (5 a 0,078 µg/mL) e Anfotericina B (10 a 0,156 µg/mL).

Da mesma forma as CLM's encontradas, variaram de acordo com cada cepa testada: Cetoconazol (40 a 0,078 µg/mL), Miconazol (10 a 0,078 µg/mL), Nistatina (20 a 5 µg/mL), Clotrimazol (10 a 0,078 µg/mL), Fluconazol (5 a 1,25µg/mL), Ciclopirox olamina (10 a 0,078 µg/mL) e Anfotericina B (20 a 0,312 µg/mL) (Tabela 3).

A avaliação da cinética do crescimento microbiano é um fator importante, pois fornece informações valiosas para a realização de experimentos microbiológicos e de determinação do mecanismo de ação. Entre os mecanismos avaliados, a atividade inibitória e letal de substâncias pode ser determinada por meio de ensaios de tempo de morte, que permitem identificar a velocidade da ação antimicrobiana (AIYEGORO; AFOLAYAN; OKOH, 2009; SILVA, 2010).

O OELaIII foi capaz de inviabilizar todas as cepas de *Candida* após 2 horas de contato, nas concentrações de CIM e 2X CIM. As concentrações de 1/2x CIM do OELaIII foram capazes de reduzir o crescimento microbiano nas duas primeiras horas de exposição, com perfis de inibição distintos.

O ensaio de tempo de morte demonstrou que a OELaIII apresenta potencial antifúngico, pois sua ação fungistática e fungicida sobre as cepas testadas, ocorreram em curtos intervalos de tempos de exposição (Gráficos 9-16).

A prevenção de biofilmes de *Candida* é um desafio considerável, uma vez que os biofilmes causam infecções fúngicas graves, sendo mais resistentes aos fármacos e aos sistemas

de defesa imunológica. Assim, este grave problema tem levado pesquisadores a estudar a atividade anti-biofilme de óleos essenciais (TRINDADE *et al.*, 2015; ALVES-SILVA *et al.*, 2016).

Os biofilmes são geralmente compostos por uma ou várias espécies, formando os chamados biofilmes monoespécie ou multiespécies, respectivamente, que também mostram uma maior resistência a agentes antimicrobianos e antifúngicos, e podem envolver deterioração e microrganismos patogênicos. Também envolvem células microbianas sésseis que são diferentes da sua forma planctônica, uma vez que têm um fenótipo alterado e características metabólicas diferentes (PAGÁN; GARCÍA-GONZALO, 2015; GALIE, 2018).

No presente estudo foi avaliada a atividade anti-biofilme do OELaIII sobre cepas de *Candida*. Inicialmente as cepas foram classificadas quanto a sua capacidade de aderir e formar biofilme na microplaca, sendo escolhidas as cepas de *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 13803, para a realização dos ensaios de avaliação da atividade anti-biofilme (Tabela 4; Gráfico17).

O ensaio de determinação da CIMB demonstrou que a mesma concentração de OELaIII necessária para inibir o crescimento microbiano em células planctônicas das cepas de *Candida* (*C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 13803), é também capaz de impedir o desenvolvimento de biofilme por estas cepas, o que sugere que o OELaIII interfere no início da formação do biofilme (Tabela 5; Gráficos 18 a 20).

Vários estudos comprovam a inibição da formação do biofilme de bactérias e fungos por óleos essenciais e fito constituintes (KHAN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2014; KIM *et al.* 2015; SIVARANJANI *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016).

Eradicar a formação de biofilmes fúngicos é um desafio. A formação de biofilmes é uma estratégia importante para a sobrevivência, resistência e patogenicidade. Os terpenos e extratos ricos em flavonóides demonstraram reduzir a expressão de moléculas de adesão e agregação, reduzindo a viabilidade do biofilme (LI *et al.*, 2019).

A avaliação da atividade do OELaIII sobre biofilmes de *Candida* já formados, demonstrou que a CMEB foi de 5 mg/mL, sendo este valor igual para todas as cepas testadas (Tabela 6). A concentração de 2,5 mg/mL (1/2x CMEB) foi capaz de reduzir de maneira parcial o biofilme formado, com redução de 3,09; 4,36 e 1,94 log UFC/mL, respectivamente, para as cepas *C. parapsilosis* ATCC 90018, *C. albicans* ATCC 10231 e *C. tropicalis* ATCC 13803 (Gráficos 21 a 23). As concentrações necessárias para erradicar o biofilme já formado foram de 4 a 32 vezes maiores que a CIM e CLM.

Antifúngicos utilizados na clínica geralmente são ineficazes contra certos biofilmes de *Candida* ou necessitam de altas doses para erradicá-los, o que pode causar efeitos adversos intensos. Em geral, os agentes antifúngicos eliminam células planctônicas livres, mas são muitas vezes ineficazes contra biofilmes, principalmente pela remoção incompleta, que pode resultar em reinfecções resistentes (DELATTIN *et al.*, 2014).

A fim de reduzir a dosagem de agentes antifúngicos, prevenindo a toxicidade, efeitos adversos, efeitos colaterais e interações medicamentosas, vários estudos desenvolvem estratégias para combinar moléculas bioativas, que podem interagir e determinar efeitos sinérgicos, aditivos ou antagônicos (EFFERTH; KOCH, 2011).

Os óleos essenciais podem ser responsáveis por modular a atividade de compostos com atividade antimicrobiana, quer seja uma modulação positiva (sinergismo), negativa (antagonismo) ou indiferente. Assim, a utilização de produtos naturais com medicamentos convencionais (antimicrobianos ou antifúngicos) merece uma maior atenção (ROCHA, 2012).

O ensaio de *checkerboard* pode ser utilizado para testar a atividade antimicrobiana de associações de diferentes substâncias, e o efeito dessas associações pode ser mensurado pelo cálculo das concentrações inibitórias fracionadas (CIF) das associações testadas (ORHAN *et al.*, 2005).

No presente estudo foi determinada a ocorrência de modulação da atividade de antifúngicos pela ação do OELaIII. Para isso, foram construídos gráficos do tipo isoblograma, utilizando os valores de CIF (Concentração Inibitória Fracionada) e calculado os valores de ICIF (Índice da Concentração Inibitória Fracionada) das associações.

Para o efeito modulador do OELaIII nas associações com antifúngicos utilizados na clínica, foram constatados diferentes perfis de modulação (Tabelas 7 a 13), com uma predominância de efeitos sinérgicos e aditivos para as cepas testadas, quando associadas a agentes antifúngicos comerciais padrão. Podemos chamar a atenção para a interação OELaIII-CET que apresentou cerca de 70,83% de associações sinérgicas, com redução de 16 vezes a CIM do cetoconazol (Tabela 8).

Oliveira *et al.* (2016) observou que o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (Linn.) foi capaz de modular positivamente a atividade antifúngica do Cetoconazol, reduzindo em até 16 vezes sua CIM, entretanto, os efeitos observados para a associação com Miconazol e Nistatina, resultaram em sua maioria em efeito antagônicos e indiferentes, respectivamente.

Batista *et al.* (2018) utilizando o OELa (quimiotipo - gerânio, neral e mirceno) observaram uma modulação sinérgica na ação da ciprofloxacina, cefepime, e ceftriaxona contra

cepas de *Salmonella* e *Shigella*, reduzindo também a massa do biofilme de ambas quando expostas a combinação (OELa-Ciprofloxacina).

Num outro estudo utilizando OELa quimiotipo (sabineno, (E)-cariofileno e limoneno) foi observada uma atividade modulatória sinérgica em combinações com antifúngicos clínicos padrão, resultando na inibição de todas as cepas testadas de *Trichophyton rubrum*, e de três cepas de *Candida* (COSTA *et al.*, 2020).

Os ensaios de sinergismo desempenham um papel de liderança na procura de novos compostos antimicrobianos e antifúngicos para melhorar a utilização de substâncias já conhecidas. Um estudo mostrou atividades sinérgicas antimicrobianas e anti-biofilme com florfenicol associado a óleos essenciais de *Lippia sidoides* e *Cymbopogon citratus* contra *Aeromonas hydrophila* (SILVA *et al.*, 2020).

Substâncias presentes em óleos essenciais podem aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática microbiana, pela ação direta sobre seus componentes. Além disso, existem mecanismos de interação sinérgica entre óleos essenciais e antimicrobianos que inibem o metabolismo microbiano (LAMBERT *et al.*, 2001; SANTIESTEBAN-LÓPEZ; PALOU; LÓPEZ-MALO, 2007).

O aumento da liberação de ácidos nucleicos após a exposição das cepas de *Candida* ao OELaIII, sugere a ocorrência de danos no envoltório celular, constatada nos gráficos (31 a 38). A exposição das cepas *Candida* a 2x CIM de OELaIII determinou um significativo aumento na absorvância de 260 nm, durante a primeira hora de exposição, indicando extravasamento celular de material genético. A CIM do OELaIII também apresentou valores de liberação de material genético elevados, enquanto a 1/2x CIM determinou valores intermediários quando comparado ao controle sem tratamento.

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e fitoconstituintes sobre bactérias Gram-positivo e fungos parece ocorrer através da extravasamento dos componentes citoplasmáticos, mediados pela destruição do envoltório celular microbiano (COX *et al.*, 2000).

O aumento da liberação de proteínas após a exposição das cepas de *Candida* ao OELaIII, também reforça a hipótese da ocorrência de danos no envoltório celular. Todas as concentrações de OELaIII (1/2x CIM, CIM e 2x CIM) elevaram a presença de material proteico no sobrenadante, quando comparados ao grupo controle, principalmente nos primeiros 60 minutos de exposição, quando houve uma elevação significativa nos valores de OD280nm (Gráficos 39 a 46).

A parede celular fúngica é caracterizada como uma estrutura relativamente rígida que apresenta vários processos dinâmicos essenciais a célula. Além de determinar o formato

celular, ela fornece suporte osmótico, proteção física, e está relacionada a eventos de sinalização, adesão e reprodução (MAGNELLI; CIPOLLO; ROBBINS, 2005; NIMRICHTER *et al.*, 2005), sendo por isso necessária para o crescimento e desenvolvimento dos fungos (DURAN; NOMBELA, 2004).

O sorbitol é um protetor osmótico e sua presença diminui a ação antifúngica de agentes que atuam sobre a parede celular, impedindo sua lise. Em nosso estudo, avaliamos o mecanismo de ação do OELaIII sobre a parede celular, na presença do sorbitol e observamos que os valores de CIM foram aumentados (16 a 2x CIM), indicando a presença da proteção osmótica, o que reforça a ideia do mecanismo de ação do OELaIII sobre a parede celular (Tabela 14).

Abrantes (2013) observou que o potencial antifúngico do óleo essencial de *M. spicata* L. foi reduzido na presença de sorbitol, sugerindo que os dois principais componentes (carvona e limoneno) atuam diretamente na parede celular fúngica.

A membrana celular também tem sido relatada como alvo da ação de óleos essenciais e seus componentes, em diversos estudos anteriores (DUARTE *et al.*, 2012). Sua ação se dá pela interação de seus componentes e a estrutura lipídica da membrana, causando lise celular e liberação de proteínas, ocasionando a morte das células.

O ergosterol é um importante lipídeo presente na membrana de células fúngicas, sua presença externa pode levar a interação com outras moléculas, como óleos. Em nosso estudo, observamos que a atividade antifúngica do OELaIII foi reduzida na presença do ergosterol, com concentrações aumentadas, variando de 64 a 4x CIM, sugerindo que seu mecanismo de ação se baseia no rompimento da membrana celular (Tabela 15).

A estrutura e a função da membrana plasmática em células fúngicas são essenciais para a manutenção da vida dos fungos, enquanto alterações na síntese ou na manutenção das mesmas, geralmente resulta em letalidade (CARMEN *et al.*, 2014).

É consenso que grande parte das candidemias é antecedida pelo evento de colonização do paciente pela mesma espécie de levedura associada a infecção, contudo as infecções sistêmicas por *Candida spp.* podem ser adquiridas por via exógena, através do contato das mãos (WEINSTEIN & HOTA, 2004).

Assim, a capacidade da levedura nos processos de adesão e infecção, em conjunto, é definida como potencial de virulência ou patogenicidade. Os fatores de virulência são determinados geneticamente, porém expressos em determinadas situações (TAMURA *et al.*, 2007).

Observamos em nosso estudo que somente as cepas *C. albicans* ATCC 10231, *C. albicans* ATCC 90028, *C. parapsilosis* ATCC 90018 e *C. tropicalis* ATCC 750 são produtoras de proteinase e que o OELaIII somente inibiu ação desta enzima na cepa *C. tropicalis* ATCC 750, nas concentrações de 1/2x (0,312 mg/mL) e 1/4x (0,156 mg/mL) da CIM (Tabela 16).

Entre as enzimas mais importantes secretadas pelas cepas de *Candida*, tem-se a fosfolipase, que degrada fosfolipídios da membrana das células e está relacionada a uma maior adesão a células epiteliais, portanto, com maior patogenicidade (RUSSAS, 2016).

Observamos em nosso estudo que as concentrações de OELaIII não foram capazes de inibir a atividade da fosfolipase pelas cepas de *Candida* expostas as concentrações do óleo essencial (Tabela 17).

Estudos de citotoxicidade de compostos naturais com potencial atividade terapêutica são importantes, pois definem o potencial de degeneração ou morte celular provocado pelos constituintes fitoquímicos (VASCONCELLOS *et al.*, 2005). A avaliação da estabilidade mecânica da membrana eritrocitária é um bom indicador de danos provocados por vários compostos como triagem de citotoxicidade (SHARMA & SHARMA, 2001).

Através da hemólise, ocorre a liberação de hemoglobina livre no plasma, o que pode acarretar sérios danos a órgãos vitais como o fígado, os rins e o coração (CARVALHO *et al.*, 2007), tornando-se extremamente necessário a verificação desta atividade em produtos naturais. O efeito do OELaIII em diferentes concentrações, sobre eritrócitos de carneiro desfibrinados, demonstrou que o há uma atividade hemolítica, com IC₅₀ de 2,42 mg/mL (Gráfico 47).

Os resultados do presente trabalho evidenciam um potencial antifúngico do OELaIII, assim como demonstram efeitos moduladores diversos, inibição parcial de fatores de virulência e mecanismo de ação voltado para o envoltório microbiano de cepas de *Candida*.

9 CONCLUSÃO

O OELaIII apresentou atividade fungicida e fungistática sobre cepas de *Candida*, atuando sobre fatores de virulência e provocando alterações no envoltório celular. Apesar de apresentar diversos perfis de modulação, podemos ressaltar seu efeito sinérgico com o antifúngico cetoconazol e uma moderada atividade hemolítica. Os resultados deste trabalho sugerem que o OELaIII é uma promissora alternativa terapêutica para o desenvolvimento de formulações com atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABÍLIO, Freire et al. Actividad antifúngica de productos naturales indicados por vendedores de hierbas (raizeiros) para el tratamiento de la candidiasis oral. **Revista Cubana de Estomatología**, v. 51, n. 3, p. 259-269, 2014.

ABRANTES, M. R. de. **Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre candida não albicans de origem clínica**. 2013. Tese de doutorado. Natal: Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

ADAMS, Robert P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 5. ed. Texensis Publishing, 2017.

AGUIAR, Jaciana S. et al. Antimicrobial activity of Lippia alba (Mill.) NE Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 436-440, 2008.

AHMAD, Aijaz et al. Antifungal activity of Coriaria nepalensis essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against Candida. **Yeast**, v. 28, n. 8, p. 611-617, 2011.

ALVES-SILVA, Jorge M. et al. New claims for wild carrot (Daucus carota subsp. carota) essential oil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

AIYEGORO, O. A.; AFOLAYAN, A. J.; OKOH, A. I. In vitro antibacterial time kill studies of leaves extracts of Helichrysum longifolium. **Journal of medicinal plants research**, v. 3, n. 6, p. 462-467, 2009.

AMARAL, J. F. D. et al. **Atividade antiinflamatória, antinociceptiva, e gastroprotetora do óleo essencial de Croton sonderianus muell. arg.** Tese de Doutorado. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará. 2004.

ANIBAL, Paula Cristina et al. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, n. 4, p. 824-831, 2010.

AOKI, Shigeji et al. Comparative pathogenicity of a wild-type strain and respiratory mutants of Candida albicans in mice. **Zentralblatt für Bakteriologie**, v. 273, n. 3, p. 332-343, 1990.

BAG, A.; CHATTOPADHYAY, R. R.; GALDIERO, M. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. **PLoS One**, v. 10, p. e0131321, 2015.

BARON, E. J.; PETERSON, I. R.; FINEGOLD, S. M. **Diagnostic Microbiology**. 9 ed. Mosby, St. Louis:: 1994.

BASMACIYAN, L. et al. Candida albicans interactions with the host: crossing the intestinal epithelial barrier. **Tissue Barriers**, v. 7, n. 2, p. 1612661, 2019.

BATISTA, A. et al. Modulatory effect of Lippia alba essential oil on the activity of clinically used antimicrobial agents on Salmonella typhi and Shigella dysenteriae biofilm. **Scientia Pharmaceutica**, v. 86, n. 4, p. 52, 2018.

BHAVNANI, Sujata M.; BALLOW, Charles H. New agents for Gram-positive bacteria. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 5, p. 528-534, 2000.

BÔAS, Villas; DE KRUSE, Glauco; GADELHA, Carlos Augusto Grabois. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 23, p. 1463-1471, 2007.

BOŽOVIĆ, Mijat et al. Essential oil extraction, chemical analysis and anti-Candida activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Ball—New approaches. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 203, 2017.

BRAGA, Pier Carlo; RICCI, Davide. Atomic force microscopy: application to investigation of *Escherichia coli* morphology before and after exposure to cefodizime. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 42, n. 1, p. 18-22, 1998.

BRITO, D. I. V. et al. Phytochemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and of the Thymol against *Candida* strains. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, p. 836-844, 2015.

BROWN, Gordon D. et al. Hidden killers: human fungal infections. **Science translational medicine**, v. 4, n. 165, p. 165rv13-165rv13, 2012.

BUSH, Karen et al. Tackling antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 894, 2011.

BUTLER, Mark S.; BLASKOVICH, Mark AT; COOPER, Matthew A. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. **The Journal of antibiotics**, v. 70, n. 1, p. 3, 2017.

CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001.

CANNON, R. D. et al. Efflux-mediated antifungal drug resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 22, n. 2, p. 291-321, 2009.

CARMEN, Gâlea; HANCU, Gabriel. Antimicrobial and antifungal activity of *Pelargonium roseum* essential oils. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 4, n. Suppl 2, p. 511, 2014.

CASTRO, D. M. **Efeitos da variação sazonal, colheita selecionada e diferentes temperaturas de secagem sobre a produção de biomassa, rendimento e composição de óleos essenciais de Lippia alba (Mill.) NE Br. ex. Britt e Wilson (Verbenaceae)**. Botucatu: UNESPFCA. 132p Tese doutorado, 2001.

CASTRO, R. D. **Atividade antifúngica do óleo essencial de Cinnamomum zeylanicum Blume (Canela) e de sua associação com antifúngicos sintéticos sobre espécies de Candida**. Tese de doutorado. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 169p. 2010.

CASETTI, F. et al. Antimicrobial activity against bacteria with dermatological relevance and skin tolerance of the essential oil from *Coriandrum sativum* L. fruits. **Phytother Res**, v. 26, p. 420-424, 2012.

CECHINEL FILHO, Valdir; YUNES, Rosendo A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química nova**, v. 21, n. 1, p. 99-105, 1998.

CHEN, H. et al. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. **Virulence**, v. 11, n. 1, p. 337-348, 2020.

CHIES, C. E. et al. Antioxidant Effect of *Lippia alba* (Miller) NE Brown. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 194-205, 2013.

CIUREA, C. N. et al. *Candida* and candidiasis—opportunism versus pathogenicity: a review of the virulence traits. **Microorganisms**, v. 8, n. 6, p. 857, 2020.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Approved standard**. CLSI M27-A3. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana de produtos naturais. **Revista Conceitos**, v. 77, p. 77-85, 2004.

COSTA, P. S. et al. Antifungal Activity and Synergistic Effect of Essential oil from *Lippia alba* Against *Trichophyton rubrum* and *Candida* spp. **Rev. Virtual Quim**, v. 12, p. 1529-1540, 2020.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of applied microbiology**, v. 88, n. 1, p. 170-175, 2000.

CRAVEIRO, A. A. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. Edições UFC, 1981.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. **Crop protection**, v. 22, n. 1, p. 39-44, 2003.

DAVID, B.; WOLFENDER, J-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DE ARAUJO, J. C. L. V. et al. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre microrganismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista de Patologia Tropical**, v. 33, n. 1, p. 55-64, 2004.

DE RAPPER, S.; VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S. The in vitro antimicrobial effects of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with conventional antimicrobial agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

DELATTIN, N. et al. Repurposing as a means to increase the activity of amphotericin B and caspofungin against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 4, p. 1035-1044, 2014.

DEVI, K. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107-115, 2010.

DI PASQUA, Rosangela et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v. 10, n. 5, p. 1040-1049, 2010.

DODOU, H. V. et al. Violacein antimicrobial activity on *Staphylococcus epidermidis* and synergistic effect on commercially available antibiotics. **Journal of applied microbiology**, v. 123, n. 4, p. 853-860, 2017.

DOMENICO, Enea Gino Di et al. The clinical Biofilm Ring Test: a promising tool for the clinical assessment of biofilm-producing *Candida* species. **FEMS yeast research**, 2018.

DUARTE, A. et al. Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3-4, p. 236-238, 2012.

DURÁN, Angel; NOMBELA, César. Fungal cell wall biogenesis: building a dynamic interface with the environment. **Microbiology**, v. 150, n. 10, p. 3099-3103, 2004.

EDRIS, Amr E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy research**, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

EFFERTH, T.; KOCH, E. Complex interactions between phytochemicals. The multi-target therapeutic concept of phytotherapy. **Curr Drug Targets**, v. 12, p. 122-132, 2011.

ESCOBAR, Patricia et al. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

EUCAST. Determination of minimum inhibitory concentrations (MICs) of antibacterial agents by broth dilution. **Clinical Microbiology Journal**, v. 9, n. 8, p. 1-7, 2003.

FERREIRA, Gabriela Lacet Silva et al. Antibiofilm Activity and Mechanism of Action of the Disinfectant Chloramine T on *Candida* spp., and Its Toxicity against Human Cells. **Molecules**, v. 22, n. 9, p. 1527, 2017.

FRANCO, E. A. P.; BARROS, R. F. M. Uso e diversidade de plantas medicinais no Quilombo Olho D'água dos Pires, Esperantina, Piauí. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 3, p. 78-88, 2006.

FRATERNALE, D.; GENOVESE, S.; RICCI, D. Essential oil composition and antimicrobial activity of aerial parts and ripe fruits of *Echinophora spinosa* (Apiaceae) from Italy. **Natural product communications**, v. 8, n. 4, p. 527-530, 2013.

FREIRES, Irlan de Almeida et al. *Coriandrum sativum* L.(coriander) essential oil: antifungal activity and mode of action on *Candida* spp., and molecular targets affected in human whole-genome expression. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e99086, 2014.

GALIE, S. et al. Biofilms in the food industry: health aspects and control methods. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 898, 2018.

GARCIA-RUBIO, R. et al. The fungal cell wall: *Candida*, *Cryptococcus*, and *Aspergillus* species. **Frontiers in microbiology**, v. 10, p. 2993, 2020.

GAVANJI, S. et al. Comparative efficacy of herbal essences with amphotricin B and ketoconazole on *Candida albicans* in the in vitro condition. **Integrative medicine research**, v. 4, n. 2, p. 112-118, 2015.

GEROMINI, K. V. N. et al. Fungicidal effect of *Lippia alba* essential oil on a white-rot fungus. Maderas. **Ciencia y tecnología**, v. 17, n. 1, p. 29-38, 2015.

GIRÓN, L. M. et al. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 34, n. 2-3, p. 173-187, 1991.

GOMES, E. C. et al. Constituintes do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 74, n. 2, p. 29-32, 1993.

GOODMAN GILMAN, Alfred; HARDMAN, Joel G.; LIMBIRD, Lee W. **Goodman & Gilman las bases farmacológicas de la terapéutica**. McGraw-Hill, 2003.

GONÇALVES, L. A. et al. Produção e composição do óleo essencial de alfavaquinha (*Ocimum selloi* Benth.) em resposta a dois níveis de radiação solar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 6, n. 1, p. 8-14, 2003.

GONSALVES, W. C.; CHI, A. C.; NEVILLE, B. W. Common oral lesions: Part I. Superficial mucosal lesions. **American family physician**, v. 75, n. 4, 2007.

HANI, U. et al. Candidiasis: a fungal infection-current challenges and progress in prevention and treatment. **Infectious Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Infectious Disorders)**, v. 15, n. 1, p. 42-52, 2015.

HATANO, V. Y. et al. Anxiolytic effects of repeated treatment with an essential oil from *Lippia alba* and (R)-(-)-carvone in the elevated T-maze. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 3, p. 238-243, 2012.

HELDWEIN, C. G. et al. Participation of the GABAergic system in the anesthetic effect of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown essential oil. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 45, n. 5, p. 436-443, 2012.

HENNEBELLE, T. et al. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chemistry & biodiversity**, v. 3, n. 10, p. 1116-1125, 2006.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n. 2, p. 211-222, 2008.

HÖFS, S.; MOGAVERO, S.; HUBE, B. Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. **Journal of microbiology**, v. 54, n. 3, p. 149-169, 2016.

HUANG, H. et al. Effect of aromatherapy on preoperative anxiety in adult patients: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Complementary Therapies in Clinical Practice**, v. 42, p. 101302, 2021.

JABRA-RIZK, M. A.; FALKLER, W. A.; MEILLER, T. F. Fungal biofilms and drug resistance. **Emerging infectious diseases**, v. 10, n. 1, p. 14, 2004.

JANNUZZI, H. et al. Agronomic evaluation and identification of *Lippia alba* chemotypes from Distrito Federal, Brazil. **Horticultura Brasileira**, v. 28, n. 4, p. 412-417, 2010.

JARADAT, Nidal et al. Chemical composition, anthelmintic, antibacterial and antioxidant effects of *Thymus bovei* essential oil. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 418, 2016.

JARADAT, Nidal et al. Variability of Chemical Compositions and Antimicrobial and Antioxidant Activities of *Ruta chalepensis* Leaf Essential Oils from Three Palestinian Regions. **BioMed research international**, v. 2017, 2017.

JARAMILLO-COLORADO, Beatriz et al. Anti-quorum sensing activity of essential oils from Colombian plants. **Natural product research**, v. 26, n. 12, p. 1075-1086, 2012.

JORDÁ, T.; PUIG, S. Regulation of ergosterol biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genes**, p. 795, 2020.

JULIÃO, L. S. et al. Cromatografia em camada fina de extratos de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill) NE Br.(erva-cidreira). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, p. 36-38, 2003.

KHAMENEH, B. et al. Review on plant antimicrobials: a mechanistic viewpoint. **Antimicrobial Resistance & Infection Control**, v. 8, n. 1, p. 1-28, 2019.

KEAN, R.; RAMAGE, G. Combined antifungal resistance and biofilm tolerance: the global threat of *Candida auris*. **Msphere**, v. 4, n. 4, p. e00458-19, 2019.

KHAN, Mohd Sajjad Ahmad; MALIK, Abida; AHMAD, Iqbal. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. **Medical Mycology**, v. 50, n. 1, p. 33-42, 2012.p

KIM, Yong-Guy et al. Cinnamon bark oil and its components inhibit biofilm formation and toxin production. **International journal of food microbiology**, v. 195, p. 30-39, 2015.

KORDALEWSKA, M. et al. Understanding echinocandin resistance in the emerging pathogen *Candida auris*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 62, n. 6, p. e00238-18, 2018.

KONEMAN, E. W. et al. Diagnóstico Microbiológico–Texto e Atlas Colorido. 5. ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2001.

KOO, H. A. et al. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 15, n. 12, p. 740, 2017.

KORNITZER, Daniel. Regulation of *Candida albicans* hyphal morphogenesis by endogenous signals. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 21, 2019.

KOVAČ, Jasna et al. Antibiotic resistance modulation and modes of action of (-)- α -pinene in *Campylobacter jejuni*. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122871, 2015.

KURTZMAN, Cletus P.; FELL, Jack W. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. In: **The Yeasts (Fourth Edition)**. 1998. p. 3-5.

LAM, Otto LT et al. Oral health promotion interventions on oral yeast in 107ananga107ized and medically compromised patients: a systematic review. **Mycoses**, v. 55, n. 2, p. 123-142, 2012.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LANGEVELD, Wendy T.; VELDHUIZEN, Edwin JA; BURT, Sara A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.

LAXMINARAYAN, Ramanan et al. Antibiotic resistance—the need for global solutions. **The Lancet infectious diseases**, v. 13, n. 12, p. 1057-1098, 2013.

LEE, Kayeon et al. Anti-biofilm, anti-hemolysis, and anti-virulence activities of black pepper, 107ananga, myrrh oils, and nerolidol against *Staphylococcus aureus*. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 98, n. 22, p. 9447-9457, 2014.

LEITE, A. M. **Avaliação da atividade biológica de óleos essenciais sobre espécies bacterianas potencialmente causadoras de endocardite infecciosa**. Tese de doutorado. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba: 113p. 2007.

LEVY, Stuart B.; MARSHALL, Bonnie. Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. **Nature medicine**, v. 10, n. 12s, p. S122, 2004.

LI, Xinlong et al. Assessing the impact of curcumin on dual-species biofilms formed by *Streptococcus mutans* and *Candida albicans*. **Microbiologyopen**, v. 8, n. 12, p. e937, 2019.

LIMA, Igara Oliveira et al. Antifungal activity and mode of action of carvacrol against *Candida albicans* strains. *Journal of essential oil research*, v. 25, n. 2, p. 138-142, 2013.

LÓPEZ, Molkary Andrea; STASHENKO, Elena E.; FUENTES, Jorge Luis. Chemical composition and antigenotoxic properties of *Lippia alba* essential oils. **Genetics and molecular biology**, v. 34, n. 3, p. 479-488, 2011.

LV, F.; LIANG, H.; YUAN, Q.; LI, C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms. **Food Res Int**, v.44, n. 9, p. 3057–64, 2011.

LYON, Juliana Pereilinhaesra et al. Predisposing conditions for *Candida* spp. carriage in the oral cavity of denture wearers and individuals with natural teeth. **Canadian journal of microbiology**, v. 52, n. 5, p. 462-467, 2006.

MACHADO, Terezinha Feitosa et al. The antimicrobial efficacy of *Lippia alba* essential oil and its interaction with food ingredients. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 2, p. 699-705, 2014.

MACIEL, Maria Aparecida M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGNELLI, Paula E.; CIPOLLO, John F.; ROBBINS, Phillips W. A glucanase-driven fractionation allows redefinition of *Schizosaccharomyces pombe* cell wall composition and structure: assignment of diglucan. **Analytical biochemistry**, v. 336, n. 2, p. 202-212, 2005.

MAMUN-OR-RASHID, A. N. M. et al. A comprehensive ethno-pharmacological review on *Lippia alba* M. **International Journal of Biomedical Materials Research**, v. 1, n. 1, p. 14-20, 2013.

MARQUES, Carlos A. et al. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **ver Bras Farmacogn**, v. 18, p. 415-429, 2008.

MARTINEZ, Jose Luis et al. A global view of antibiotic resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 33, n. 1, p. 44-65, 2008.

MARTINI, N. D.; KATERERE, D. R. P.; ELOFF, J. N. Biological activity of five antibacterial flavonoids from *Combretum erythrophyllum* (Combretaceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 93, n. 2-3, p. 207-212, 2004.

MATOS, FJ de A. As ervas cidreiras do Nordeste do Brasil. Estudo de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae) Parte II-Farmacquímico **Rev Bras Farm**, v. 77, p. 137-141, 1996.

MATOS, FJ de A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. Fortaleza: UFC, 2000.

MATASYOH, Lexa G. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 6, 2007.

MIGUEL, Maria Graça. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, 2010.

MINA, Sara et al. COVID-19 and Fungal Infections: A Double Debacle. **Microbes and Infection**, p. 105039, 2022.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Biomas brasileiros. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biomas>. Acesso em: 15 mar. 2018.

MOGHIMI, Roya et al. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. **Food chemistry**, v. 194, p. 410-415, 2016.

MUSTHAFA, Khadar Syed et al. Antifungal potential of eugenyl acetate against clinical isolates of *Candida* species. **Microbial pathogenesis**, v. 99, p. 19-29, 2016.

NIMRICHTER, Leonardo et al. The multitude of targets for the immune system and drug therapy in the fungal cell wall. **Microbes and infection**, v. 7, n. 4, p. 789-798, 2005.

NOLDIN, V.; F. **Estudo fitoquímico das folhas e rizomas de Simaba ferruginea St. Hil. e avaliação da atividade antiúlcera e antinociceptiva dos extratos e compostos isolados.** Dissertação de Mestrado. Itajaí: Faculdade de Ciências Farmaceuticas. Universidade do Vale do Itajaí. 91p. 2005.

OLIVEIRA, L. B. S. et al. Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, p. 511-523, 2016.

OLIVERO-VERBEL, Jesus et al. Composition, anti-quorum sensing and antimicrobial activity of essential oils from *Lippia alba*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 3, p. 759-767, 2014.

O'NEILL, Jim. **Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations.** The review on antimicrobial resistance. London: AMR, 2016.

ORHAN, Gani et al. Synergy tests by E test and checkerboard methods of antimicrobial combinations against *Brucella melitensis*. **Journal of clinical microbiology**, v. 43, n. 1, p. 140-143, 2005.

OTAÍZA O, FERNANDO. Políticas de control de antimicrobianos en el nivel hospitalario. **Revista chilena de infectología**, v. 19, p. 219-221, 2002.

PAGÁN, R.; GARCÍA-GONZALO, D. Influence of environmental factors on bacterial biofilm formation in the food industry: a review. **Postdoc j.**, n. ART-2015-95845, 2015.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of ethnopharmacology**, v. 76, n. 3, p. 201-214, 2001.

PATRA, Jayanta Kumar; BAEK, Kwang-Hyun. Antibacterial activity and action mechanism of the essential oil from *Enteromorpha linza* L. against foodborne pathogenic bacteria. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 388, 2016.

PEIXOTO, Juliana Vieira et al. Candidíase: uma revisão de literatura. **Bras J Surg Clin Res**, v. 8, p. 75-82, 2014.

PERLIN, D. S.; RAUTEMAA-RICHARDSON, R.; ALASTRUEY-IZQUIERDO, A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. **The Lancet infectious diseases**, v. 17, n. 12, p. e383-e392, 2017.

PINTO, E., VALE-SILVA, L., CAVALEIRO, C., SALGUEIRO, L. Antifungal activity of the clove essential oil from *Syzygium aromaticum* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **J Med Microbiol**, v. 58, n. 11, p. 1454–62, 2009.

POLAK, Annemarie. Virulence of *Candida albicans* mutants. **Mycoses**, v. 35, n. 1-2, p. 9-16, 1992.

PORFÍRIO, Emanuela Mesquita et al. In Vitro Antibacterial and Antibiofilm Activity of *Lippia alba* Essential Oil, Citral, and Carvone against *Staphylococcus aureus*. **The Scientific World Journal**, v. 2017, 2017.

RABES, Anne et al. The C-type lectin receptor Mincle binds to *Streptococcus pneumoniae* but plays a limited role in the anti-pneumococcal innate immune response. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0117022, 2015.

RAJESHKUMAR, Radhakrishnan; SUNDARARAMAN, Muthuraman. Emergence of *Candida* spp. and exploration of natural bioactive molecules for anticandidal therapy–status quo. **Mycoses**, v. 55, n. 3, 2012.

RHATHER, M. A.; BHAT, B. A.; QURISHI, M. A. 2013. Multicomponent phytotherapeutic approach gaining momentum: is the “one drug fit all” model breaking down?. **Phytomedicine**, v. 21, p. 1–14, 2013.

RASTEIRO, V. M. de C. **Efeito dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* e *Melaleuca alternifolia* sobre *Candida albicans* estudo in vitro e in vivo**. Dissertação (mestrado). Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. 93p. 2011.

RAYBAUDI-MASSILIA, Rosa M. et al. Control of pathogenic and spoilage microorganisms in fresh-cut fruits and fruit juices by traditional and alternative natural antimicrobials. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 8, n. 3, p. 157-180, 2009.

REGNAULT-ROGER, Catherine; VINCENT, Charles; ARNASON, John Thor. Essential oils in insect control: low-risk products in a high-stakes world. **Annual review of entomology**, v. 57, 2012.

REICHLING, Jürgen et al. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties—an overview. **Complementary Medicine Research**, v. 16, n. 2, p. 79-90, 2009.

REYNA-BELTRÁN, E. et al. The cell wall of *Candida albicans*: A proteomics view. **Candida albicans**, v. 12, p. 71-92, 2019.

ROCHA, L. Q. **Interferência do óleo essencial de folhas do quimiotipo II de *Lippia alba* (MILL.) NE BROWN na atividade antimicrobiana da oxacilina sobre *staphylococcus aureus* oxacilina-resistente**. 2012. 125 p. (Dissertação de Mestrado). Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.

RODRIGUES, A. C. C.; GUEDES, M. L. S. Utilização de plantas medicinais no Povoado Sapucaia, Cruz das Almas–Bahia. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 8, n. 2, p. 1-7, 2006.

ROMEIRO, R. S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa. Disponível em: <http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>, 2007. Acesso em: 5 abr. 2009.

RUBIOLO, P. et al. Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis. A review. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 5, p. 282-290, 2010.

SAINI, Mohan Lal et al. Comparative pharmacognostical and antimicrobial studies of *Acacia* species (Mimosaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 2, n. 12, p. 378-386, 2008.

SANTIESTEBAN-LÓPEZ, A.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Susceptibility of food-borne bacteria to binary combinations of antimicrobials at selected aw and pH. **Journal of applied microbiology**, v. 102, n. 2, p. 486-497, 2007.

SANTOS, Nara O. dos et al. Cytotoxic and antimicrobial constituents from the essential oil of *Lippia alba* (Verbenaceae). **Medicines**, v. 3, n. 3, p. 22, 2016.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SERRACARBASSA, Pedro Duraes; DOTTO, Patrícia. Endoftalmite por *Candida albicans*. **Arq Bras Oftalmol**, p. 701-707, 2003.

SETTE-DE-SOUZA, Pedro Henrique et al. Antibacterial activity and phytochemical screening of extracts of *Lippia alba* (Mill). NE Brown. **African Journal of Microbiology Research**, v. 8, n. 29, p. 2783-2787, 2014.

SHARMA, Poonam; SHARMA, Jayashri Devi. In vitro hemolysis of human erythrocytes—by plant extracts with antiplasmodial activity. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 3, p. 239-243, 2001.

SHARMA, Neeta; TRIPATHI, Abhishek. Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. **Microbiological Research**, v. 163, n. 3, p. 337-344, 2008.

SHEN, Suxia et al. Effects of cinnamaldehyde on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* membrane. **Food Control**, v. 47, p. 196-202, 2015.

SHIN, S.; LIM, S. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. **Journal of applied microbiology**, v. 97, n. 6, p. 1289-1296, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004.

SILVA, A. F. et al. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.(Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2003.

SILVA, Maria Silene da et al. Medicinal plants used for ailments of the gastro-intestinal tract at Colonia Treze village, Lagarto Municipality, Sergipe State, Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 815-829, 2006.

SILVA, Nathália Cristina Cirone. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 67p. 2010.

SILVA, R. E. R. da et al. *Lippia alba* (Mill.) NE Br. ex Britton & P. Wilson. In: **Medicinal and Aromatic Plants of South America**. Springer, Dordrecht, 2018. p. 289-298.

SILVA, A. F. E et al. Antibacterial and antibiofilm activities and synergism with florfenicol from the essential oils of *Lippia sidoides* and *Cymbopogon citratus* against *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 132, n. 3, p. 1802-1812, 2022.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Artmed Editora, 2016.

SIVARANJANI, Murugesan et al. Morin inhibits biofilm production and reduces the virulence of *Listeria monocytogenes*—An in vitro and in vivo approach. **International journal of food microbiology**, v. 237, p. 73-82, 2016.

SONG, XUN et al. A review of natural products with anti-biofilm activity. **Current Organic Chemistry**, v. 22, n. 8, p. 789-817, 2018.

SOUZA, Caio Marcelo Cury et al. Antifungal activity of plant-derived essential oils on *Candida tropicalis* planktonic and biofilms cells. **Sabouraudia**, v. 54, n. 5, p. 515-523, 2016.

STASHENKO, Elena E.; JARAMILLO, Beatriz E.; MARTÍNEZ, Jairo René. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, n. 1, p. 93-103, 2004.

STEPANOVIĆ, Srdjan et al. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. **Journal of microbiological methods**, v. 40, n. 2, p. 175-179, 2000.

TAMURA, Nathalie Kira et al. Fatores de virulência de *Candida* spp isoladas de cateteres venosos e mãos de servidores hospitalares. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 1, p. 91-93, 2007.

TAVARES, Walter. Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos. In: **Manual de antibióticos e quimioterápicos antiinfeciosos**, 1996.

TAVARES, E. S. et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) NE Br.(Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 1, p. 1-5, 2005.

TEIXEIRA, Andréa Bessa. **Avaliação das atividades antimicrobianas antioxidante dos óleos essenciais das folhas dos quimiotipos I, II e III de Lippia alba (Mill.) NE Brown**. Universidade Federal do Ceará. 2009. Tese de Doutorado. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae)—a literature review. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 5, p. 471-485, 1996.

THAKRE, A. et al. Limonene inhibits *Candida albicans* growth by inducing apoptosis. **Medical Mycology**, v. 56, n. 5, p. 565-578, 2018.

TORTORA, Gerard J. et al. **Microbiology: an introduction**. San Francisco, CA: Benjamin Cummings, 2004.

TOSCANO GONZALEZ, Jarvis. Uso tradicional de plantas medicinales en la vereda San Isidro, municipio de San José de Pare-Boyacá: un estudio preliminar usando técnicas cuantitativas. **Acta biol. colomb**, v. 11, n. 2, p. 137-1146, 2006.

TREASE, G. E.; EVANS, W. C. **Textbook of Pharmacognosy**. Balliere. Tindall, London, 1983.

TRINDADE, Leonardo Antunes et al. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. **Clinical oral investigations**, v. 19, n. 9, p. 2223-2231, 2015.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. Dec. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas—liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VAN VUUREN, S. F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 462-472, 2008.

VASCONCELLOS, M. C. et al. Bioactivity of biflorin, a typical o-naphthoquinone isolated from *Capraria biflora* L. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 60, n. 5-6, p. 394-398, 2005.

VERMA, R. K; CHAURASIA, L.; KUMAR, M. Antifungal activity of essential oils against selected building fungi. **Indian J Nat Prod Resour**, v. 2, n. 4, p. 448–51, 2011.

VIRTUOSO, S. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 137-142, 2005.

XIA, JINXING et al. Immunosuppressed Patients with Clinically Diagnosed Invasive Fungal Infections: The Fungal Species Distribution, Antifungal Sensitivity and Associated Risk Factors in a Tertiary Hospital of Anhui Province. **Infection and Drug Resistance**, v. 15, p. 321, 2022.

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2-3, p. 97-110, 2009.

WALKER, G. M.; WHITE, N. A. Introduction to fungal physiology. **Fungi: biology and applications**, p. 1-35. 2017.

WANG, Cui et al. Hemolysis of human erythrocytes induced by melamine–cyanurate complex. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 402, n. 4, p. 773-777, 2010.

WEI, Lee Seong; WEE, Wendy. Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. **Iranian journal of microbiology**, v. 5, n. 2, p. 147, 2013.

WEINSTEIN, Robert A.; HOTA, Bala. Contamination, disinfection, and cross-colonization: are hospital surfaces reservoirs for nosocomial infection?. **Clinical infectious diseases**, v. 39, n. 8, p. 1182-1189, 2004.

WURTZEL, Eleanore T.; KUTCHAN, Toni M. Plant metabolism, the diverse chemistry set of the future. **Science**, v. 353, n. 6305, p. 1232-1236, 2016.

ZARDO, Vanessa; MEZZARI, Adelina. Os antifúngicos nas infecções por *Candida* sp. **NewsLab**, v. 63, p. 136-146, 2004.

ZHANG, N.; YAO, L. Anxiolytic effect of essential oils and their constituents: a review. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 50, p. 13790-13808, 2019.

ZHOU, Kang et al. Mode of action of pentocin 31-1: an antilisteria bacteriocin produced by *Lactobacillus pentosus* from Chinese traditional ham. **Food Control**, v. 19, n. 8, p. 817-822, 2008.

ZUZARTE, M. et al. Antifungal activity of phenolic-rich *Lavandula multifida* L. essential oil. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases**, v. 31, n. 7, p. 1359-1366, 2012.

ANEXOS



Scientia
Pharmaceutica



MDPI
Open Access
Journal



Article

Antifungal and Modulatory Activity of Lemon Balm (*Lippia alba* (MILL.) N. E. BROWN) Essential Oil

Gleilton Sales ^{*}, Suelen Medeiros ^{*}, Igor Soares ^{*}, Tiago Sampaio ^{*}, Mary Bandeira, Nádia Nogueira and Maria Queiroz

Faculty of Pharmacy, Federal University of Ceará, Street Samuel Silas Munguba 1210, Ceará 60430-375, Brazil; igordima.6@gmail.com (I.S.); tiagosampaio91@gmail.com (T.S.); mambandeira@yahoo.com.br (M.B.); acciolufu@gmail.com (N.N.); magorq@gmail.com (M.Q.)

* Correspondence: gleilton@hotmail.com (G.S.); sumedeiros86@gmail.com (S.M.)

Abstract: Fungal diseases and the progressive development of resistance are a challenge. In this context, *Lippia alba* (lemon balm) is a species used in folk medicine, being described with antimicrobial potential. The aim of this study was to determine the antifungal activity and modulating effect of the essential oil of *Lippia alba* (MILL.) N.E. Brown leaves (LaEO). The antifungal activity of LaEO on eight *Candida* strains was determined by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum lethal concentration (MLC), minimum biofilm inhibition concentration (MBIC), minimum biofilm eradication concentration (MBEC) and time-kill. The checkerboard technique was used to determine the modulating effect of LaEO on antifungal activity. The results indicate the presence of 11 constituents, with a predominance of carvone (58.15%) and limonene (25.37%). LaEO was able to inhibit the growth of all tested microorganisms, with MIC and MLC ranging from 0.078 to 1.25 mg/mL and MBIC and MBEC ranging from 0.156 to 5 mg/mL. The time-kill assay showed that LaEO was able to eliminate the strains after two hours of exposure and the best association was observed for the combination of LaEO and ketoconazole. The results of the study indicate that LaEO has excellent antifungal activity with potential biotechnological application.

Keywords: *Lippia alba*; essential oil; *Candida*; antifungal activity; modulatory effect



Citation: Sales, G.; Medeiros, S.; Soares, I.; Sampaio, T.; Bandeira, M.; Nogueira, N.; Queiroz, M. Antifungal and Modulatory Activity of Lemon Balm (*Lippia alba* (MILL.) N.E. BROWN) Essential Oil. *Sci. Pharm.* **2022**, *90*, 31. <https://doi.org/10.3390/scipharm90020031>

Academic Editor: Helen D. Skellern

Received: 1 April 2022

Accepted: 2 May 2022

Published: 11 May 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Antimicrobial resistance has increased exponentially in recent decades and is considered one of the greatest health challenges of the current century. It is estimated that 700,000 individuals die worldwide every year due to infections caused by resistant strains, and this number could increase to approximately 10 million worldwide by 2050 if there is no intervention [1].

Fungal infections are consequences of the health problems often associated with immunosuppression. Clinical success depends on the response to the antifungal therapy, presenting high mortality. Unfortunately, treatment options are restricted due to the limited availability of antifungals [2].

Candida sp. are opportunistic agents responsible for several diseases, ranging from skin and mucosal infections to systemic infections. *Candida albicans* accounts for more than 70% of all *Candida* infections; however, there has been an increase in clinical cases related to species such as *Candida parapsilosis* and *Candida krusei* [3].

Several mechanisms of resistance to antifungals have been described; among them is the formation of biofilm, which can lead to limitations in the use of available drugs. Furthermore, the indiscriminate use of these drugs increases the resistance, which has stimulated the use of gradually higher doses and broad-spectrum antifungals, which has increased the reporting of adverse reactions [4].

Considering the increased microbial resistance to multiple drugs, such as antifungals, synergistic combinations between natural molecules and commercial drugs may be good



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Certidão

Cadastro nº A0F234C

Declaramos, nos termos do art. 41 do Decreto nº 8.772/2016, que o cadastro de acesso ao patrimônio genético ou conhecimento tradicional associado, abaixo identificado e resumido, no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado foi submetido ao procedimento administrativo de verificação e não foi objeto de requerimentos admitidos de verificação de indícios de irregularidades ou, caso tenha sido, o requerimento de verificação não foi acatado pelo CGen.

Número do cadastro: **A0F234C**
 Usuário: **Universidade Federal do Ceará**
 CPF/CNPJ: **07.272.636/0001-31**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Lippia alba

Título da Atividade: **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E MODULADORA DO ÓLEO ESSENCIAL DO QUIMIOTIPO III (LIMONENO E CARVONA) DE Lippia alba (MILL.) N. E. BROWN.**

Equipe

NÁDIA ACCIOLY PINTO NOGUEIRA	Universidade Federal do Ceará
Gleilton Weyne Passos Sales	Universidade Federal do Ceará
Hilania Valéria Dodou	Universidade Federal do Ceará
Andressa Hellen de Moraes Batista	Universidade Federal do Ceará
Suelen Carneiro de Medeiros	Universidade Federal do Ceará
Matheus Lima Rodrigues	Universidade Federal do Ceará
Pedro Igor de Oliveira Pereira	Universidade Federal do Ceará

Parceiras Nacionais

07.272.636/0001-31 / Universidade Federal do Ceará

Resultados Obtidos

Divulgação de resultados em meios científicos ou de comunicação

Identificação do meio onde foi divulgado: **XVI**

Data do Cadastro: **23/05/2018 13:51:56**

Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético