

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Lippia origanoides* Kunth. E EUCALIPTOL
SOBRE *Candida* spp. ISOLADAS DE PACIENTES
ONCOLÓGICOS**

Daniel Furtado Silva

SAPIENTIA AEDIFICAT

2024

DANIEL FURTADO SILVA

**AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia
origanoides* Kunth. E EUCALIPTOL SOBRE *Candida spp.*
ISOLADAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS**

**ANTIFUNGAL EVALUATION OF *Lippia organoides* Kunth.
ESSENTIAL OIL AND EUCALYPTOL ON *Candida spp.* ISOLATED
FROM ONCOLOGY PATIENTS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas /Fisiopatologia dos tecidos buco-maxilo-faciais.

Orientadora: Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima
Coorientador: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho

João Pessoa
2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BIBLIOTECÁRIO:

S586a Silva, Daniel Furtado.

Avaliação antifúngica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. E eucaliptol sobre *Candida* spp. Isoladas de pacientes oncológicos / Daniel Furtado Silva. - João Pessoa, 2024.

74 f. : il.

Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima.

Coorientação: Abrahão Alves de Oliveira Filho.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Candidíase bucal. 2. Resistência fúngica a medicamentos. 3. Antifúngico. 4. Neoplasias de cabeça e pescoço. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Oliveira Filho, Abrahão Alves de. III. Título.

UFPB/BC

CDU 616.31-002(043)

Informações Complementares:

Título em outro idioma: Antifungal evaluation of *Lippia origanoides* Kunth. essencial oil and eucalyptol on *Candida* spp. isolated from oncology patients.

Palavras-chave em outro idioma: Oral candidiasis; *Lippia*; Antifungal drug resistance; Antifungal agents; Head and neck neoplasms.

Área de concentração: Ciências odontológicas

Linha de Pesquisa: Fisiopatologia dos tecidos buco-maxilo-faciais

Banca examinadora: Edeltrudes de Oliveira Lima (Orientador, UFPB); Heloísa Helena Pinho Veloso (UFPB); Hilzeth de Luna Freire Pessôa (UFPB); Jozinete Vieira Pereira (UEPB); Maria do Socorro Vieira Pereira (FACENE/FAMENE).

Data de defesa: 23-01-2024

Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)

- ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3319-2996>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2504913750180272>

DANIEL FURTADO SILVA

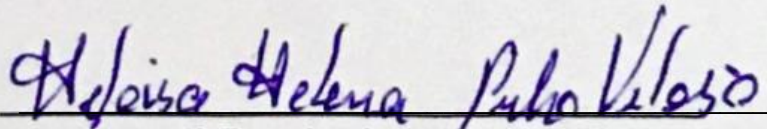
**AVALIAÇÃO ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia
origanoides* Kunth. E EUCALIPTOL SOBRE *Candida* spp.
ISOLADAS DE PACIENTES ONCOLÓGICOS**

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a defesa de Tese apresentada em sessão pública no dia 23 de Janeiro de 2024 e atribuiu o conceito Aprovado.



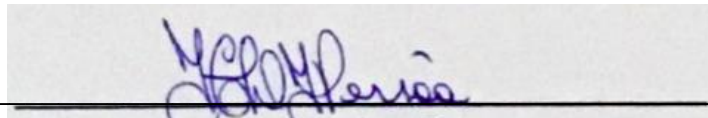
Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

Orientador - UFPB



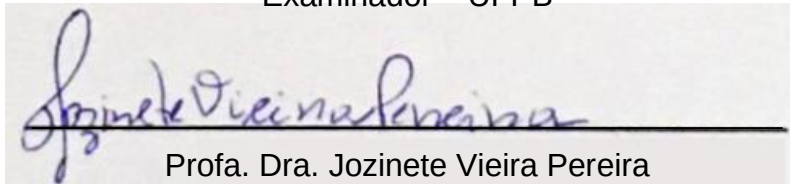
Profa. Dra. Heloísa Helena Pinho Veloso

Examinador – UFPB



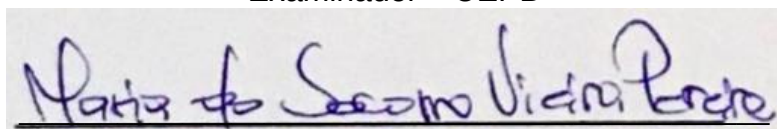
Profa. Dra. Hilzeth de Luna Freire Pessôa

Examinador – UFPB



Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira

Examinador – UEPB



Profa. Dra. Maria do Socorro Vieira Pereira

Examinador – FACENE/FAMENE

DEDICATÓRIA

Dedico primeiramente a Deus, meu Senhor, que me conduziu de acordo com a Sua vontade, provendo para que essa jornada de aprendizado, de alguma forma, se torne instrumento de frutificação, para honra e glória ao Seu nome.

Dedico à Ana e Alice, bençãos concedidas por Deus e que são luz na minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por toda Graça concedida, para honra e glória ao Seu nome.

Ao Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti, Coordenador do Curso de Pós-Graduação de Odontologia da Universidade Federal da Paraíba, por sua atenção, disponibilidade, e por ser um exemplo profissional.

À Prof^a. Dr^a. Edeltrudes de Oliveira Lima, minha orientadora, pela confiança, paciência, atenção, disponibilidade, empenho e amabilidade.

Ao Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho, meu coorientador, por toda a atenção, disponibilidade e auxílio no desenvolvimento da pesquisa.

À minha esposa, Ana Carolina Lyra de Albuquerque, a maior incentivadora desta realização, pela cumplicidade em todos os momentos, por seu amor e compreensão, pelos sacrifícios, além das inúmeras e incansáveis motivações que me fazem almejar sonhos maiores.

À minha filha, Alice Albuquerque Furtado, por todo seu amor, me inspirando a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus pais, Álvaro de Albuquerque Silva e Suzana dos Santos Furtado de Albuquerque Silva, por todo amor, dedicação, e pelos ensinamentos que me transformaram em quem sou.

Aos meus irmãos, Luís Eduardo Furtado Silva e Arthur Furtado Silva, pelo amor e incentivo.

Aos colegas de pós-graduação, pelo companheirismo e solidariedade.

A todos que, de alguma forma, participaram da concretização desse sonho, cujos nomes peço perdão por não estarem aqui citados.

Aos participantes da pesquisa. Sua participação foi fundamental para um melhor entendimento sobre a infecção oportunista por Candida em pacientes oncológicos.

Ao Hospital Napoleão Laureano, pela presteza e disponibilidade do espaço físico.

À CAPES, ao PPGO-UFPB e à Universidade Federal da Paraíba, pelo apoio institucional recebido.

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

EPIÍGRAFE

“Tudo o que fizerem, façam de todo o coração, como para o Senhor, e não para os homens, sabendo que receberão do Senhor a recompensa da herança. É a Cristo, o Senhor, que vocês estão servindo.”

Colossenses 3: 23-24

RESUMO

Introdução: A candidíase bucal é uma manifestação frequentemente encontrada após tratamento radioterápico de pacientes com neoplasias em região de cabeça e pescoço, que pode gerar um aumento da morbidade e mortalidade devido ao imunocomprometimento e disseminação da infecção fúngica. A citotoxicidade apresentada pelos antifúngicos convencionais e o aumento da resistência fúngica também são uma preocupação atual. **Objetivos:** Identificar o perfil epidemiológico atual dos pacientes diagnosticados com neoplasias malignas localizadas anatomicamente em região de cabeça e pescoço, avaliar a atividade antifúngica e citotoxicidade do óleo essencial de *L. origanoides* Kunth. (OE) e eucaliptol (EUC), sobre isolados de *Candida* spp. **Materiais e métodos:** Este estudo avaliou os aspectos sociodemográficos, clínicos e terapêuticos dos pacientes oncológicos. Foi realizada coleta micológica da cavidade bucal de pacientes que concluíram tratamento radioterápico. Experimentos *in vitro* foram realizados para avaliar a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM), mecanismo de ação, e associação com antifúngicos padrões. Também foi avaliado o potencial hemolítico em eritrócitos. Os dados foram analisados por meio de estatística descritiva e inferencial uni e bivariada, com uso dos testes Qui-Quadrado e cálculo do coeficiente V de Cramer. Para a interpretação dos dados, foi considerado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$) e intervalo de confiança de 95%. **Resultados:** Os achados demonstraram maior prevalência de neoplasia em homens (54,9%), entre 60 e 69 anos (35,4%), feodermas (78%), com ensino fundamental incompleto (26,8%). A neoplasia mais prevalente foi o carcinoma de células escamosas (CEC) (63,4%), as áreas mais acometidas foram encéfalo (32,9%), seguido da língua (26,8%), o tratamento composto pela associação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia foi o mais adotado (46,3%), e a dosagem de radioterapia mais utilizada foi entre 70 e 79 Gy (43,8%). Entre os pacientes que participaram da coleta micológica, 57,1% apresentaram fluxo salivar baixo, e 14,3% muito baixo. O diagnóstico de candidíase bucal foi confirmado em 71,4%, com predominância de *Candida tropicalis* (43%), além da inédita identificação de infecção da cavidade bucal por *Candida magnoliae*. Observou-se forte atividade antimicrobiana tanto no OE (CIM entre 32 e 512 $\mu\text{g/mL}$) quanto no EUC (CIM entre 64 e 512 $\mu\text{g/mL}$). Identificou-se potencial fungicida do OE e EUC (CFM/CIM ≤ 4) sobre as linhagens isoladas, com resistência à nistatina (NIS) (CIM entre 128 e 512

µg/mL) e anfotericina B (ANF) (CIM entre 2 e 8 µg/mL). Os isolados de *Candida albicans* apresentaram maior sensibilidade ao OE e EUC. Os achados sugerem atuação na membrana plasmática fúngica, além do efeito de aditividade na associação do OE com ANF (0,625), e EUC com NIS (0,75). A análise toxicidade demonstrou baixa atividade hemolítica do OE e EUC até 100 µg/mL, com menor relação citotóxica sobre hemácias do tipo A. **Conclusão:** Os resultados desta pesquisa demonstram a relevância do monitoramento da resistência fúngica e também do desenvolvimento de novos antimicrobianos na promoção da saúde e sobrevivência do paciente oncológico.

Palavras-chave: Candidíase bucal; *Lippia*; Resistência fúngica a medicamentos; Antifúngico; Neoplasias de cabeça e pescoço.

ABSTRACT

Introduction: Oral candidiasis is a manifestation frequently found after radiotherapy treatment of patients with neoplasms in the head and neck region, which can generate an increase in morbidity and mortality due to immunocompromise and dissemination of the fungal infection. The cytotoxicity presented by conventional antifungals and the increase in fungal resistance are also a current concern. **Aims:** Identify the current epidemiological profile of patients diagnosed with malignant neoplasms anatomically located in the head and neck region, evaluate the antifungal activity and cytotoxicity of the essential oil of *L. origanoides* Kunth. (OE) and eucalyptol (EUC), on *Candida* spp. **Materials and methods:** This study evaluated the sociodemographic, clinical and therapeutic aspects of these oncology patients. Mycological collection was performed from the oral cavity of patients who completed radiotherapy treatment. *In vitro* experiments were conducted to evaluate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicide Concentration (MFC), mechanism of action, and association with standard antifungals. The hemolytic potential in erythrocytes was also evaluated. The data were analyzed using uni and bivariate descriptive and inferential statistics, using the Chi-Square tests and calculating Cramer's V coefficient. To interpret the data, a significance level of 5% ($p < 0.05$) and a confidence interval of 95% were considered. **Results:** The findings demonstrated a higher prevalence of neoplasia in men (54.9%), between 60 and 69 years old (35.4%), pheoderma (78%), with incomplete primary education (26.8%). The most prevalent neoplasm was squamous cell carcinoma (SCC) (63.4%), the most affected areas were the brain (32.9%), followed by the tongue (26.8%), the treatment consisted of a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy was the most adopted (46.3%), and the most used radiotherapy dosage ranged between 70 and 79 Gy (43.8%). Among the patients who participated in the mycological collection, 57.1% had low salivary flow, and 14.3% had very low salivary flow. The diagnosis of oral candidiasis was confirmed in 71.4%, with a predominance of *Candida tropicalis* (43%), in addition to the unprecedented identification of infection at the oral cavity by *Candida magnoliae*. Strong antimicrobial activity was observed in both EO (MIC between 32 and 512 $\mu\text{g/mL}$) and EUC (MIC between 64 and 512 $\mu\text{g/mL}$). The EO and EUC presented fungicidal potential ($\text{MFC/MIC} \leq 4$) on the isolated strains, with resistance to nystatin (NIS) (MIC between 128 and 512 $\mu\text{g/mL}$) and amphotericin B (ANF) (MIC between

2 and 8 µg/mL). *Candida albicans* isolates showed greater sensitivity to EO and EUC. The findings suggest action on the fungal plasma membrane, in addition to the additive effect in the association of EO with ANF (0.625), and EUC with NIS (0.75). The toxicity analysis demonstrated low hemolytic activity of EO and EUC up to 100 µg/mL, with less cytotoxicity on type A erythrocytes. **Conclusion:** The results of this research demonstrate the relevance of monitoring fungal resistance and also the development of new antimicrobials in promoting the health and survival of cancer patients.

Keywords: Oral candidiasis; *Lippia*; Antifungal drug resistance; Antifungal agents; Head and neck neoplasms.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANF	Anfotericina B
ASD	<i>Agar Sabouraud</i> Dextrose
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIF	Concentração Inibitória Fracionada
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CSD	Caldo Sabouraud Dextrose
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMSO	Dimetilsulfóxido
EUC	Eucaliptol
EUCAST	<i>European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
ICIF	Índice de Concentração Inibitória Fracionada
LM	Laboratório de Micologia
OE	Óleo essencial
OEITC	Organização Europeia para a Investigação e Tratamento do Câncer
OMS	Organização Mundial da Saúde
NIS	Nistatina
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UFC	Unidades Formadores de Colônia
USA	<i>United States of America</i>

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Presença de leveduras do gênero <i>Candida</i> e o câncer bucal	15
2.2 Tratamentos para candidíase bucal e presença de resistência fúngica	17
2.3 <i>L. origanoides</i> como possibilidade de tratamento antifúngico	18
3. OBJETIVOS	22
4. Artigo 1	23
5. CONSIDERAÇÃO GERAIS	46
6. CONCLUSÃO	53
REFERÊNCIAS	55
APÊNDICE 1: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	71
APÊNDICE 2: Formulário de diagnóstico epidemiológico	72
ANEXO 1: Parecer do CEP	73
ANEXO 2: Protocolo do SisGen	74

1. INTRODUÇÃO

O câncer é uma patologia que representa um grande desafio à saúde humana. Estudos recentes apontam que a taxa de sobrevivência, representada por uma relação entre mortalidade e incidência, vem crescendo de forma desproporcional (Zhang et al., 2022).

O aumento significativo na incidência e mortalidade relacionadas ao câncer é uma tendência global em rápida expansão. Esse crescimento é principalmente atribuído às mudanças demográficas e epidemiológicas que estão ocorrendo em escala mundial. No contexto brasileiro, projeta-se um número expressivo de 704 mil novos casos de câncer durante o período de 2023 a 2025 (Santos et al., 2023; Sung et al., 2020). Santos e colaboradores (2023) definiram o perfil epidemiológico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço tratados entre janeiro de 2010 e dezembro de 2020, e observaram que o cancer bucal foi o mais prevalente (36,5%), sendo a língua o sítio mais acometido (21,1%).

Os cânceres em estágio inicial são tratados com modalidade única, geralmente composta por uma intervenção cirúrgica, que pode ser associada ou não a reconstrução. Por outro lado, cânceres mais avançados necessitam de tratamento multimodal, incluindo cirurgia, radioterapia, quimioterapia e imunoterapia (Huang, Sullivan, 2013; Subash et al., 2022).

As principais disfunções orais que ocorrem nos pacientes com câncer em região de cabeça e pescoço durante as fases de tratamento e pós-tratamento são: mucosite oral, xerostomia, dificuldades alimentares, dificuldades de deglutição (disfagia), alterações no paladar (dysosmia) e disfunção na fala. Geralmente, a xerostomia está associada à hipossalivação o que ocasiona o aparecimento de infecções oportunistas como a candidíase bucal, Estomatite protética, alterações no pH, alteração na secreção de Imunoglobulina A. Também podem ocorrer cárie decorrente de radiação, cálculos e cistos salivares (Brook, 2020; Chen, 2019).

O desenvolvimento da candidíase está geralmente associado às mudanças no microambiente do hospedeiro, proporcionando a transição de um comportamento comensal para um comportamento patogênico. Essa alteração

depende de alguns fatores como: adesinas de superfície celular, enzimas proteolíticas, mudança morfológica e desenvolvimento de resistência a medicamentos (Vila et al., 2020). As infecções fúngicas apresentam difícil resolutividade principalmente pela resistência a drogas antifúngicas, expressão de fatores de virulência e a alta capacidade de formação de biofilme (Cavalheiro, Teixeira, 2018).

A candidíase bucal, com frequência, apresenta-se como uma lesão ativa, podendo haver dor, sensação de queimação, alteração do paladar e infecção sistêmica. Clinicamente, pode apresentar manifestações diferentes, entre as quais, destacam-se as formas de candidíase pseudomembranosa, candidíase eritematosa, candidíase hiperplásica, e a queilite angular. A acurácia do diagnóstico utilizando apenas a apresentação clínica é em média de 50%, o que demonstra uma subestimação da candidíase bucal clínica (Chitapanarux et al., 2021).

Espécies de *Candida* compõem a quarta causa mais comum de infecção nosocomial da corrente sanguínea e estão associadas a uma taxa de mortalidade de aproximadamente 50% (Gefferes, Gastmeier, 2011; Wenzel, Gennings, 2005). De acordo com sua evolução e a resposta do hospedeiro, a candidíase bucal pode resultar em morbidade significativa do paciente por meio de disfagia, desidratação e desnutrição (Salvatori et al., 2016).

As mais frequentes ocorrências de candidíase bucal estão relacionadas de forma decrescente à *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*), *Candida krusei* (*C. krusei*), *Kodamaea ohmeri* (*K. ohmeri*), e *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), havendo vários estudos que demonstram a resistência destes fungos à diversos medicamentos, além do risco de infecção sistêmica (Badiie et al., 2017; Bilal et al., 2022; Cavalheiro, Teixeira, 2018; Quindós et al., 2014; Vázquez-Olvera et al., 2023). Apesar da patogenia da infecção por *Candida* spp. ser multifatorial, a imunossupressão e a hipossalivação, encontrada nos pacientes em tratamento oncológico para câncer em região de cabeça e pescoço, representam dois fatores significativos para o favorecimento do desequilíbrio da microbiota bucal, promovendo uma intensificação da sua virulência, comprovado pelo aumento da diversificação de *Candida* spp. (Azizi, Rezaei, 2009; Panghal et al., 2012; Redding et al., 2004; Suryawanshi et al., 2012).

A saliva é enriquecida com proteínas antimicrobianas que auxiliam na limitação da ligação de fungos ao epitélio bucal, e esse biofluido é majoritariamente responsável pela manutenção destes microrganismos em seu estado comensal (Salvatori et al., 2016).

A resistência fúngica frente aos agentes antimicrobianos convencionais vem se tornando uma forte ameaça à saúde pública e aos sistemas de saúde em todo o mundo (Brancini et al., 2016; Marquez, Quave, 2020). Além disso, os efeitos adversos ocasionados por estes medicamentos, muitas vezes, inviabilizam a sua prescrição e administração devido à condição sistêmica do paciente (Ansari et al., 2016; Boatto et al., 2016). Dessa maneira, a urgência relativa à descoberta de novas terapias antifúngicas configura-se como algo extremamente necessário e desafiador (Brancini et al., 2016; Marquez, Quave, 2020). Recentemente, surgiram algumas novas alternativas ao tratamento da candidíase bucal, como as equinocandinas (anidulafungina, caspofungina) e o isavuconazol, de alto custo (Quindós et al., 2019).

A *Lippia origanoides* Kunth (L. *origanoides*), anteriormente conhecida como *Lippia sidoides* Cham., e popularmente denominada de “alecrim-pimenta”, é conhecida por seu caráter aromático e uso medicinal como alternativa terapêutica. Produz um óleo essencial caracterizado por ser constituído de monoterpenos, diterpenos, triterpenos e compostos fenólicos que proporcionam ação antimicrobiana para diversos patógenos (Alexa et al. 2018, Gusmão et al., 2022), tendo sido utilizada na medicina tradicional em decorrência de suas atividades biológicas (Araújo et al. 2020).

A preocupação com a resistência fúngica e a citotoxicidade dos antifúngicos atuais associada ao grau de fragilidade do paciente após tratamento oncológico são fatores que nortearam este estudo, com a finalidade de propor novas alternativas como possibilidade terapêutica para o tratamento da candidíase bucal. Desta forma, este estudo tem o objetivo de promover uma melhoria na rede de cuidado e, conseqüentemente, na qualidade de vida desses pacientes.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Presença de leveduras do gênero *Candida* e o câncer bucal

Há diversos estudos que relacionam a presença de *Candida* spp. ao quadro clínico de câncer bucal. Alguns mencionam a presença da mesma na cavidade bucal em uma anterioridade à neoplasia, sendo a maioria associada ao imunocomprometimento da neoplasia; outros descrevem a sua presença mais evidente relacionada ao tratamento, com a possibilidade de candidemia sistêmica, à medida que ocorre a progressão da neoplasia. Em uma pesquisa de análise de regressão logística identificou-se o aumento da idade (média de 65 anos) e o uso de próteses dentárias como fatores de risco associados à colonização bucal por leveduras. Neste mesmo estudo, *C. albicans* foi a levedura dominante (74%), sendo *C. glabrata* a segunda mais comum (11,5%), seguidas por *C. tropicalis* (2,6%) e *C. krusei* (2,6%) (Schelenz et al., 2011).

A presença de *Candida* spp. sempre esteve associada à posterior reação de imunocomprometimento do paciente, em decorrência do tratamento ou de processos imunológicos relacionados ao câncer bucal. Alnuaimi e colaboradores (2015) avaliaram a diversidade de leveduras do gênero *Candida* que colonizavam a cavidade bucal de pacientes com câncer bucal e outras regiões do corpo, no qual observou-se que a probabilidade de câncer bucal foi 3,24 vezes maior para aqueles com *Candida* spp. do que para aqueles sem o microrganismo. Neste mesmo estudo, uma descoberta proeminente foi o efeito conjunto aditivo altamente significativo da presença de *Candida* spp. e do consumo de álcool.

Jahanshiri e colaboradores (2018) analisaram pacientes iranianos com câncer em região de cabeça e pescoço tratados com radioterapia. Entre os 54 pacientes com candidíase orofaríngea evidente, foram coletados um total de 60 isolados clínicos, dos quais, a distribuição quanto ao gênero foi de 16 (26,6%) isolados do sexo feminino e 44 (73,3%) do sexo masculino, onde observou-se que as infecções mistas (duas ou mais espécies de *Candida*) foram observadas em

cinco casos. Os resultados revelaram que 53,3% de todos os isolados clínicos eram *C. albicans*, seguidos por 21,6% de *C. tropicalis*, e 15% de *C. glabrata*.

Diaz e colaboradores (2019) avaliaram a presença de candidíase bucal em pacientes que realizavam quimioterapia, e observaram que 20% de todos os indivíduos desenvolveram candidíase bucal. Usando estatísticas multivariadas, identificaram o tabagismo e a quantidade de biofilme dental como preditores básicos do desenvolvimento de candidíase bucal durante o tratamento. Todos os indivíduos que desenvolveram candidíase bucal tinham comunidades microbiomas de base dominadas por *Candida* spp. e enriquecidas em bactérias acidúricas. Longitudinalmente, a candidíase bucal foi associada à diminuição do fluxo salivar antes do desenvolvimento da lesão, e ocorreu simultaneamente ou antes da mucosite oral. A candidíase também foi longitudinalmente associada a uma diminuição nos neutrófilos periféricos. Neste estudo, *C. albicans* e *Candida dubliniensis* foram as espécies mais abundantes.

Li e colaboradores (2017) desenvolveram um estudo retrospectivo de caso-controle realizado em pacientes internados durante o período de 2006 a 2013. As análises foram realizadas entre pacientes oncológicos com candidemia como grupo de estudo e pacientes com infecções bacterianas da corrente sanguínea como controle. *C. albicans* foi identificada como a espécie mais prevalente e responsável por 55,0% de candidemia, seguida por *C. parapsilosis complex* (21,3%), *C. tropicalis* (8,8%), *C. glabrata complex* (7,5%), *Candida lusitanae* (3,8%) e *Candida fama* (3,8%). A análise logística demonstrou que a nutrição parenteral por período superior a cinco dias ($p = 0,036$), o uso de cateter urinário por mais de dois dias ($p = 0,001$), a metástase em órgãos distantes ($p = 0,002$), e o câncer gastrointestinal ($p = 0,042$) foram os fatores de risco independentes para candidemia. Outrossim, a candidemia apresentou mortalidade de 30%, significativamente maior do que as infecções bacterianas da corrente sanguínea ($p = 0,006$), sendo *C. albicans* citada como o patógeno primário.

Em um estudo de vigilância da candidemia em pacientes com câncer, realizado pela Organização Europeia para a Investigação e Tratamento do Câncer (OEITC), foram observados 249 episódios de candidemia. *C. albicans* foi isolada em 70% (63) dos 90 casos envolvendo pacientes com tumores sólidos. A

mortalidade geral em 30 dias foi de 39% (97 de 249). Em uma análise univariada, *C. glabrata* foi associada à maior taxa de mortalidade. Duas análises multivariadas mostraram que a mortalidade estava associada à idade avançada e à gravidade da doença de base (Viscoli et al., 1999).

2.2 Tratamentos para candidíase bucal e presença de resistência fúngica

Atualmente, é restrito o arsenal de antifúngicos utilizados para o tratamento de candidíase bucal em pacientes sob tratamento oncológico para neoplasias em região de cabeça e pescoço. Atualmente, evidencia-se uma tendência para resistência destes medicamentos quanto ao seu uso, por diversos fatores. Em uma meta-análise, observou-se que os efeitos dos medicamentos antifúngicos na redução do risco de taxa de cura micológica na candidíase bucal foram em ordem decrescente: itraconazol (em cápsula ou solução oral), miconazol (em comprimido ou gel oral), fluconazol, nistatina e anfotericina B (Fang et al., 2021).

Kessler e colaboradores (2022), em uma revisão sistemática e meta-análise, incluíram pesquisas observacionais que isolaram leveduras de *C. albicans* coletadas da cavidade bucal de humanos e realizaram testes de suscetibilidade à diversos antifúngicos, relatando que as menores taxas de resistência fúngica foram observadas para anfotericina B, nistatina, flucitosina e caspofungina. Em contraste, as taxas de resistência mais elevadas foram observadas para o miconazol e o econazol.

Maheeronaghsh e colaboradores (2020) selecionaram um total de 74 isolados de *Candida* spp. da cavidade bucal de 61 pacientes com câncer e candidíase bucal. Os isolados incluíram *C. albicans* (n = 56; 75,5%), *C. glabrata* (n = 4; 5,4%), *C. krusei* (n = 5, 7%), *C. tropicalis* (n = 7; 9,4%) e *Candida kefyr* (n = 2; 2,7%). Não resistentes à nistatina foram 78,4%, 10,8% ao fluconazol, e 62,16% suscetíveis à anfotericina B.

Schelenz e colaboradores (2011) avaliaram a incidência de candidíase bucal entre pacientes com câncer, e observaram algum grau de resistência global a todos

os azóis testados, dos quais 4,5% dos isolados apresentaram resistência ao fluconazol, sendo a maioria *C. glabrata* e *C. krusei*. Trinta e uma (11,7%) das leveduras foram resistentes ao itraconazol. A resistência ao cetoconazol foi observada em 11,3% dos isolados, além de se observar baixa taxa de resistência ao voriconazol (0,75%).

Jahanshiri e colaboradores (2018) avaliaram a presença de candidíase orofaríngea em pacientes com câncer em região de cabeça e pescoço, composto pela identificação de espécies, suscetibilidade antifúngica e patogenia, e relataram que havia resistência dos isolados de *C. albicans* ao fluconazol, itraconazol, cetoconazol e anfotericina B respectivamente de 62,5%, 81,2%, 93,7% e 87,5%, e que entre os isolados de outras espécies de *Candida*, a maior e a menor resistência foram observadas no cetoconazol (89,28%) e no fluconazol (42,85%).

2.3 *L. origanoides* como possibilidade de tratamento antifúngico

A ciência, através da bioprospecção, um conjunto de estratégias sequenciais utilizadas para a busca de substâncias com potencial valor para o ser humano, vem estudando cada vez mais o valor de derivados vegetais como os óleos essenciais, alcoolaturas, tinturas e extratos obtidos com diferentes solventes, com a finalidade de observar uma potencial atividade farmacológica. Geralmente, essa busca trata-se de um processo multidisciplinar bastante complexo e dinâmico, o qual já foi estudado e dividido em cinco fases: (i) fase de descoberta, identificação e coleta da planta; (ii) caracterização química bioguiada dos extratos, frações e compostos isolados; (iii) validação das atividades biológicas; (iv) toxicologia e efeitos clínicos em humanos; e, finalmente, (v) desenvolvimento de um produto comercial. Em Odontologia, verifica-se um grande interesse da comunidade científica e da indústria sobre a aplicação farmacológica de produtos naturais como agentes anticárie, antifúngicos, analgésicos, e anti-inflamatórios (Brasil, 2018; Albuquerque et al., 2016).

A literatura é composta por estudos que caracterizam os óleos essenciais da *L. origanoides*, sendo possível observar uma ampla diversidade na sua composição

química, além da possibilidade de existência de uma variabilidade infraespecífica. Desta forma, os principais fitoconstituintes descritos presentes com concentração significativa nos óleos essenciais são o timol, carvacrol, eucaliptol, isoborneol, ϵ -cariofileno, p -cimeno, carvona, β -mirceno, α -terpineno e acetato de bornila (Carvalho et al., 2013; Cavalcanti et al., 2010; Costa et al., 2018; Farias-Júnior et al., 2012; Ferreira et al., 2018; Franco 2012; Guimarães et al., 2014; Lima et al., 2011; Lima et al., 2013; Majolo et al., 2018; Marco et al., 2012; Moraes et al., 2012; Mota et al., 2012; Veras et al., 2013).

Lippia organoides Kunth, também conhecida popularmente como alecrim-pimenta, alecrim-grande ou estrepa cavalo, é uma espécie pertencente à família Verbanaceae tipicamente encontrada na região do Nordeste brasileiro. Caracterizado como um arbusto silvestre, caducifólio, ereto, com caule quebradiço muito ramificado que pode atingir até três metros de altura, apresenta folhas aromáticas simples, com margens crenadas, apresentando pelos em ambas as faces, com tamanho variável de até 8 cm. Suas flores são de cor branca, dispostas em inflorescências subglobosas a subpiramidais presentes em racimos, apresentando cálice curto e membranáceo (Matos, Oliveira, 1998; Matos, 2007). Adicionalmente, é importante destacar que a *L. sidoides* está presente na lista de plantas medicinais de interesse do SUS (Renisus) desde 2009 (Brasil, 2009), e no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira (Brasil, 2011) em decorrência do seu grande potencial terapêutico.

Os mais diversos estudos sobre as propriedades biológicas da *L. organoides* podem ser encontrados na literatura. Desta forma, é importante ressaltar a tenção dada às pesquisas que objetivam analisar a sua atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais, bem como outros produtos (extratos alcoólicos, hidroalcoólicos, ou metanólicos) extraídos da *L. organoides*, que podem ser produzidos a partir de suas folhas (secas ou frescas), caules ou caules, flores, cascas e raízes, brotos, ramos, cerne e as partes aéreas, assim como de toda a planta, são ricas em monoterpenos, conhecidos por sua atividade antimicrobiana (Botelho et al., 2009; Fontenelle et al., 2007).

Várias pesquisas se utilizam de métodos específicos para avaliação pré-clínica da atividade antifúngica da *L. organoides*. Fontenelle e colaboradores (2007) relataram atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido de *L.*

origanoides contra todas as espécies testadas pelo método de difusão em poços de ágar. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIMs) para leveduras de *Candida* spp. variaram de 620 a 2.500 mg/L e as Concentrações Fungicidas Mínimas (CFMs) variaram de 1.250 a 5.000 mg/L. Entretanto, segundo critérios propostos por Sartoratto e colaboradores (2004), essa atividade é classificada entre moderada e fraca. Outrossim, foi observado que a administração aguda do óleo essencial até 3 g/kg, por via oral em camundongos, foi desprovida de toxicidade evidente. A administração oral do óleo essencial de *L. origanoides* (117,95 mg/kg/dia) em ratos, durante 30 dias, não induziu alterações histopatológicas, hematológicas ou bioquímicas séricas significativas. Evidenciando que o óleo essencial de *L. origanoides* pode ser uma fonte promissora na busca de novos antifúngicos devido à sua eficácia e baixa toxicidade (Fontenelle et al., 2007).

Botelho e colaboradores (2007) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* em espécies bacterianas cariogênicas do gênero *Streptococcus*, bem como em leveduras de *C. albicans*, usando ensaios de diluição em caldo e difusão em disco. O óleo essencial e seus principais componentes (timol e carvacrol) exibiram potente atividade antimicrobiana nos organismos testados, sendo *C. albicans* e *Streptococcus mutans* os microrganismos mais sensíveis. Adicionalmente, Farias e colaboradores (2012) avaliaram a atividade antifúngica do extrato etanólico das folhas de *L. origanoides* contra isolados de *Candida* spp. de secreções vaginais pelo método de difusão em disco (2.000µg/disco), determinando a sua CIM, e tendo o fluconazol (25µg/disco) como controle positivo. O extrato de *L. origanoides* foi ativo como o fluconazol contra a maioria das 45 leveduras do gênero *Candida* testadas. Oito leveduras foram resistentes ao fluconazol e sensíveis ao extrato de *L. Origanoides*.

O efeito antibiofilme e antigengivite de *L. origanoides* foi avaliado através de uma investigação *in vivo* no qual vinte e três indivíduos participaram de um estudo clínico cruzado, duplo-cego, utilizando modelo experimental de gengivite onde um protetor dental foi construído para cada voluntário, evitando a escovação dos 4 dentes posteriores experimentais no quadrante inferior esquerdo no qual os sujeitos foram designados de forma aleatória inicialmente para usar o gel placebo (grupo controle) ou o gel teste, contendo 10% de *L. origanoides* (grupo teste). Nos resultados desta pesquisa observou-se que havia diferença estatisticamente

significativa e que o gel teste contendo 10% de *L. origanoides* tinha sido eficaz no controle da gengivite (Rodrigues et al., 2009). Uma pesquisa avaliou o óleo essencial de *L. origanoides* através do método de microdiluição em caldo. A fração hexânica do mesmo apresentou boa atividade antifúngica contra *Cryptococcus* sp. e *Cryptococcus gatti* (De Moraes et al., 2016).

A resistência de *Candida* spp. a medicamentos tem sido um desafio para a descoberta de novas substâncias com efeitos antimicrobianos ou moduladores que possam ser utilizadas contra a candidíase. Brito e colaboradores (2015) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *L. origanoides* e do timol contra leveduras do gênero *Candida*. As leveduras de *C. krusei* (CK LMBM 01, CK LMBM 02), *C. albicans* (CA LM 62) e *C. tropicalis* (CT LM 20) foram analisadas, e os resultados indicaram um potencial efeito antifúngico da *L. origanoides*.

Balhim e colaboradores (2019) estudaram outras formas de apresentação na utilização do óleo essencial de *L. origanoides*. Sistemas lipídicos micro e/ou nanoestruturados carregados com óleo essencial de *L. origanoides* foram desenvolvidos e apresentaram forte atividade antifúngica contra *C. albicans* (ATCC 64548). Adicionalmente, a microencapsulação por spray do óleo essencial de *L. origanoides* foi investigada, a avaliação da atividade antifúngica das micropartículas evidenciou seu potencial como agente antifúngico (Fernandes et al., 2008).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Avaliar a atividade antifúngica e citotoxicidade do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. e eucaliptol sobre isolados de *Candida* spp., bem como identificar o perfil epidemiológico de pacientes oncológicos com diagnóstico de neoplasias malignas em região de cabeça e pescoço.

3.2 Objetivos específicos

- Avaliação sociodemográfica e clínica de prontuários de pacientes atendidos no Hospital Napoleão Laureano em João Pessoa, Paraíba.
- Identificar *Candida* spp. da cavidade bucal dos pacientes que realizaram tratamento oncológico de neoplasias malignas em região de cabeça e pescoço.
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *L. origanoides* e do eucaliptol.
- Determinar o mecanismo de ação do óleo essencial de *L. origanoides* e eucaliptol na parede celular fúngica, por meio de ensaio com sorbitol.
- Determinar o mecanismo de ação do óleo essencial de *L. origanoides* e eucaliptol na membrana plasmática fúngica, por meio de ensaio com ergosterol.
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (método de associação - checkerboard) do óleo essencial de *L. origanoides* e do eucaliptol com os antifúngicos padrões.
- Avaliar o potencial hemolítico em eritrócitos humanos do óleo essencial de *L. origanoides* e do eucaliptol.

4. CAPÍTULO 1

O Manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “Scientific Reports” e encontra-se em análise.

Oral candidiasis in head and neck cancer patients: epidemiological approach and *in vitro* analysis of *Lippia organoides* Kunth antifungal activity.

Abstract

The predominance of radiotherapy indications for oncological treatment of cancers in the head and neck region reflects the growing number of late diagnoses. Oral candidiasis is frequently found after the radiotherapy, causing an increase in morbidity and mortality in these patients. The cytotoxicity presented by antifungals and increasing fungal resistance are a current concern. This study conducted an epidemiological assessment of patients with cancer in the head and neck region, mycological collection from oral cavity of patients who completed radiotherapy, and determinate antifungal activity and cytotoxicity of *Lippia organoides* Kunth. essential oil and eucalyptol on isolated yeasts. The data were analyzed using uni and bivariate descriptive and inferential statistics. For descriptive procedures, frequencies and percentages were presented. Chi-Square and Cramer's V coefficient were used for inferential procedures, with significance level of 5% ($p < 0.05$) and confidence interval of 95%. The results demonstrated a change in the profile of fungal infection, with predominance of *Candida tropicalis*, the unprecedented identification of oral cavity infection by *Candida magnoliae*, and fungal resistance profile to the antifungals tested. The substances demonstrated significant and promising antifungal properties, with low cytotoxicity, demonstrating the relevance of monitoring fungal resistance and also the development of new antimicrobials.

Keywords: Oral candidiasis; Antifungal drug resistance; *Lippia*; Antifungal agents; Head and neck neoplasms.

1. Introduction

Oral cancer is a common neoplasia that represents a major threat to human health. Recent studies indicate that the survival rate, represented by a relationship between mortality and incidence, has been growing disproportionately [1].

Early-stage cancers are treated with a single modality, generally consisting of a surgical intervention, which may or may not be associated with reconstruction. On the other hand, more advanced cancers require multimodal treatment, including surgery, radiotherapy (RTX), chemotherapy (QTX) and immunotherapy [2,3].

The main oral dysfunctions that occur in patients with head and neck cancer during the treatment and post-treatment phases are: oral mucositis, xerostomia, dysphagia, dysgeusia and speech dysfunction. Generally, xerostomia is associated with hyposalivation, which causes the appearance of opportunistic infections such as candidiasis [4,5].

The development of Candidiasis is generally associated with changes in the host's microenvironment, providing the transition from commensal to pathogenic behavior [6]. Fungal infections are difficult to resolve, mainly due to resistance to antifungal drugs, expression of virulence factors and the high capacity for biofilm formation [7].

Clinically, oral candidiasis often presents as an active lesion, with pain, burning sensation, change in taste and systemic infection. The diagnostic accuracy using only the clinical presentation is on average 50%, which demonstrates an underestimation of clinical oral candidiasis [8].

The most frequent occurrences of oral candidiasis are related in decreasing order to *Candida albicans* (*C. albicans*), *Candida tropicalis* (*C. tropicalis*), *Candida krusei* (*C. krusei*), and *Candida parapsilosis* (*C. parapsilosis*), with several studies that demonstrate the resistance of these fungi to various medications, in addition to the risk of systemic infection [7,9-12].

Fungal resistance to conventional antimicrobial agents has become a serious threat to public health and healthcare systems around the world [13, 14].

Furthermore, the adverse effects caused by these medications often make their prescription and administration impossible due to the patient's systemic condition [15, 16]. Therefore, the urgency regarding the discovery of new antifungal therapies appears to be something extremely necessary and challenging [13, 14].

In order to find new alternatives, several medicinal plants have been studied as antifungal agents. Therefore, this study aimed to evaluate the epidemiological assessment of patients diagnosed with cancer in the head and neck region, as well as analyzing the antifungal activity of the essential oil of *Lippia organoides* Kunth. (*L. organoides*) and a phytoconstituent, eucalyptol, on clinically isolated yeasts.

2. Methods

2.1 Test substance and antifungal drugs

The test substances used were *L. organoides* essential oil (EO) (Terraflor®, Brazil) and eucalyptol (EUC) (Biodinâmica®, Brazil). The antifungals used were: nystatin (NYS) and amphotericin B (AMP). The substances were solubilized in 5% dimethyl sulfoxide (DMSO) and 2% Tween 80, to obtain the necessary concentrations [17-19].

2.2 Cultures

Sabouraud Dextrose Agar (SDA) culture medium was used for yeast maintenance. Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640-L-glutamine liquid culture medium (without sodium bicarbonate) was used for antifungal assays.

2.3 Microorganisms

The isolated clinical yeasts were *C. tropicalis* (CT-01, CT-02, CT-03, CT-04, CT-05, CT-06), *C. albicans* (CA-01, CA-02, CA-03), *C. parapsilosis* (CP-01), and *C. magnoliae* (CM-01), registered in SisGen (protocol n° A5B93CE). Yeast from American Type Culture Collection (ATCC) were used as control (*C. tropicalis* ATCC

750, *C. albicans* ATCC 14053, *C. parapsilosis* ATCC 22019). To prepare the inoculum, a suspension in sterile 0.85% NaCl solution adjusted to the 0.5 scale of the McFarland standard was used, corresponding to an inoculum of approximately $1-5 \times 10^6$ colony-forming units per milliliter (CFU/mL) [19-21].

2.4 Sociodemographic assessment, sample selection and identification of the fungi presence in the oral cavity of patients with head and neck cancer.

The research was initially carried out at the Napoleão Laureano Hospital in João Pessoa, Paraíba, Brazil.

The present study was submitted to the Research Ethics Committee of the Health Sciences Center of the Federal University of Paraíba, protocol 5,885,916, in accordance with resolution 466/12 of the National Health Council/MS. The volunteers who expressed interest in participating in the research were duly informed and signed the Free and Informed Consent Form - FICF.

Inclusion criteria: adults, aged over 18 years, who had completed radiotherapy in the head and neck region, between January 2021 and July 2022. Patients using antifungal medication and who were not interested in participating were excluded.

Data collection was recorded with a form compiling sociodemographic, clinical and therapeutic information directly from the patients' medical records.

Initially, 163 records were identified, incomplete records (35) and deaths during treatment (46) were excluded. Thus, 82 medical records were evaluated for the epidemiological profile. Of these, new deaths in the period (13) were excluded, as well as patients from distant cities without mobility conditions (34), patients who had not undergone radiotherapy (17), and patients admitted to hospital for palliative treatment (04). Thus, 14 participants were able to perform mycological collection.

Samples were collected from the back of the tongue and buccal mucosa using two sterile swabs, and applied directly to a Petri dish containing SDA with chloramphenicol at 100 µg/mL, followed by incubation for 24-48 h at 35±2°C.

The yeast identification and sensitivity analysis was carried out using the Vitek® device (bioMérieux, France). The interpretation for the susceptibility test was conducted in accordance with the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

2.5 Assessment of Minimum Inhibitory Concentration (MIC)

The MICs of the substances were analyzed using the broth microdilution technique. Sterility controls were also carried out with Nystatin and Amphotericin B, cell viability assay and interference of solubilizing agents (5% DMSO and 2% Tween 80). The plates were then sealed and incubated at 35 ± 2 °C for 48 hours. After incubation, microbial growth was observed visually [20-22].

The MIC was defined as the lowest concentration to produce visible inhibition of yeast growth. The antifungal activity of the substances was interpreted as active or not active: strong activity (MIC <100 µg/mL); moderate activity (MIC >100 a 500 µg/mL); weak activity (MIC >500 a 1000 µg/mL); and inactive (MIC >1000 µg/mL) [23].

2.6 Assessment of Minimum Fungicide Concentration (MFC)

The MFC was determined after reading the MIC, in which aliquots of 10 µL supernatant from the wells where complete inhibition of fungal growth was observed (MIC, MIC × 2 and MIC × 4) in the microdilution plates were transferred to the microdilution wells. a new plate containing 100 µL of RPMI-1640 broth, which was incubated for 24 h at 35 ± 2 °C. The product is considered fungicidal when the MFC/MIC ratio is less than or equal to 4, and fungistatic when the ratio is greater than 4 [24].

2.7 Effect of antifungal on cell wall (Sorbitol Assay)

The determination of the MIC of EO and EUC against *C. tropicalis* yeasts (CT-05 and ATCC 750), in the presence of sorbitol, was carried out using the microdilution technique. In this technique, a culture medium previously added with sorbitol (MW = 182.17) at 0.8 M is used. The MIC values of the product are compared in the absence and presence of sorbitol. The experiment was carried out in triplicate and the results were expressed as the geometric mean [25, 26].

2.8 Action of antifungal on the cell membrane (Ergosterol Assay)

The MIC of EO and EUC against *C. tropicalis* (CT-05 and ATCC 750) were determined by the microdilution method, using culture medium previously added with 400µg/mL of ergosterol. The MIC values of the EO and EUC were compared in the absence and presence of ergosterol. The same procedure was performed with amphotericin B, whose mechanism of action involves interaction with ergosterol, as a positive control. The tests were carried out in triplicate and the results were expressed as the geometric mean [26].

2.9 Association assay with standard antifungals

To observe the effects of the association of EO or EUC to standard NYS or AMP drugs, the checkboard technique was carried out. In a 96-well plate, 100 µL of RPMI-1640 culture medium and 50 µL of 7-OH were added in the vertical direction of the wells, or antifungal agents were added in the horizontal direction of the wells, in concentrations corresponding to $MIC \times 8$, $MIC \times 4$, $MIC \times 2$, MIC , $MIC \div 2$, $MIC \div 4$ and $MIC \div 8$. The Suspensions of *C. tropicalis* strains were added to these wells (10 µL) and the plates were incubated at 35 ± 2 °C for 24-48 h. Subsequently, the fungal growth was analyzed and the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was calculated from the equation: $FICI = FICA + FICB$, which: “A” is the EO or EUC and “B” the standard antifungals.

FICA was calculated by the following ratio: combined MICA/isolated MICA, analogously to the FICB. The index is interpreted as follows: synergism ($FICI \leq 0.5$), indifference ($0.5 < FICI \leq 4$) and antagonism ($FICI > 4.0$) [27-29].

2.10 Assessment of cytotoxicity in human erythrocytes

The evaluation of the anti-hemolytic activity on human erythrocytes was performed with suspension of erythrocytes 0.5%. A solution of the substance test at different concentrations was incubated in tubes contain 2 mL of an erythrocyte suspension for 1h at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. As positive control for hemolysis it was used Triton X-100. Then, the preparations was centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes and the supernatant was discarded. The erythrocytes were then resuspended in a hypotonic solution of sodium chloride (0.24%) and stirred at 100 rpm for 90 minutes at $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$. After this period, the samples were centrifuged at 2500 rpm for 5 minutes and hemolysis was quantified by spectrophotometry at a wavelength of 540nm [30].

2.11 Data analysis

The data were recorded in the form of a database in the computer program SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows, version 25.0, and analyzed using uni and bivariate descriptive and inferential statistics. For descriptive procedures, raw and relative data (frequencies and percentages) were presented. Regarding inferential procedures, non-parametric statistics were used, due to the categorical (nominal) nature of the variables. To this end, the following tests were used: Chi-Square and calculation of Cramer's V coefficient. Finally, it should be noted that to interpret the information, a significance level of 5% ($p < 0.05$) and a confidence interval of 95% were considered.

3. Results

3.1 Epidemiological assessment

The epidemiological findings show that the most prevalent sociodemographic profile of patients with a positive diagnosis of malignant neoplasia in the head and neck region in the period between January 2021 and July 2022 was male (54.9%),

aged over 50 years. (83%), pheoderma (78%), single marital status (50%), incomplete primary education (26.8%), and catholic religion (52.4%) (Table 1).

Table 1. Sociodemographic characterization of the sample.

Variables	Subgroups	f	%
Gender	Male	45	54.9
	Female	37	45.1
Age range	0 - 9 years	1	1.2
	20 - 29 years	3	3.7
	30 - 39 years	4	4.9
	40 - 49 years	6	7.3
	50 - 59 years	19	23.2
	60 - 69 years	29	35.4
	70 - 79 years	14	17.1
	80 - 89 years	4	4.9
	90 - 99 years	2	2.4
Phenotype	Leucoderma	12	14.6
	Pheoderma	64	78.0
	Not declared	6	7.3
Marital status	Single	41	50.0
	Married	26	31.7
	Estable union	1	1.2
	Divorced	6	7.3
	Widower	5	6.1
	Not declared	3	3.7
Education	Illiterate	8	9.8
	Lliterate	21	25.6
	Incomplete primary education	22	26.8
	Complete primary education	4	4.9
	Incomplete high school	1	1.2
	Complete high school	7	8.5
	Incomplete higher education	4	4.9

	Complete higher education	4	4.9
	Not declared	11	13.4
Religion	Catholic	43	52.4
	Evangelical	8	9.8
	Spiritist	1	1.2
	Jehovah's Witness	1	1.2
	Not declared	29	35.4

According to clinical data, it was possible to conclude that squamous cell carcinoma was the most prevalent pathology (63.4%), with the highest frequency being intracranial tumors (32.9%), followed by tongue neoplasia (26.8%). Despite the high number of medical records with incomplete information on disease staging, the proportion of patients who presented lymphatic involvement (20.7%) and distant metastasis (18.3%) suggests a late diagnosis of these patients (Table 2).

Regarding oncological treatment, the compiled data demonstrate that the most frequently adopted therapeutic plan was multimodal (46.3%), consisting of a combination of surgery, radiotherapy and chemotherapy. Radiotherapy treatment mostly consisted of doses greater than 50 Gy (79.8%). The most used chemotherapy treatment was adjuvant (62.2%) polychemotherapy (56.8%) (Table 2).

Table 2. Description of variables related to neoplasms.

Variables	Subgroups	f	%
Neoplasm	Squamous cell carcinoma (SCC)	52	63.4
	Adenocarcinoma	6	7.3
	Metastatic melanoma	2	2.4
	Adenoid cystic carcinoma	2	2.4
	Plasmacytoma	2	2.4
	Metastatic carcinoma	3	3.7
	Metastatic clear cell carcinoma	1	1.2
	Astrocytoma	4	4.9

	Glioma	1	1.2
	Pituitary adenoma	2	2.4
	Pituitary carcinoma	1	1.2
	Glioblastoma	1	1.2
	Neuroendocrine carcinoma	2	2.4
	Linfoma	2	2.4
	Undifferentiated	1	1.2
Location	Tongue	22	26.8
	Oropharynx	9	11.0
	Pharynx	2	2.4
	Larynx	18	22.0
	Eye	4	4.9
	Brain	27	32.9
Staging	Spread to the lymph nodes	17	20.7
	Presence of metastasis	15	18.3
Recurrence	Yes	9	11.0
	No	73	89.0
Death	Yes	18	22.0
	No	64	78.0
Treatment	Surgery	10	12.2
	RTX	2	2.4
	QTX	2	2.4
	Surgery + RTX	28	34.1
	Surgery + QTX	1	1.2
	RTX + QTX	1	1.2
	Surgery + RTX + QTX	38	46.3
Chemotherapy (QTX)	Monochemoterapy	16	43.2
	Polychemoterapy	21	56.8
QTX type	Curative	2	5.4
	Adjuvant	23	62.2
	Palliative	12	32.4
RTX dose	20 - 29 Gy	1	1.6

	30 - 39 Gy	11	17.2
	40 - 49 Gy	1	1.6
	50 - 59 Gy	14	21.9
	60 - 69 Gy	8	12.5
	70 - 79 Gy	28	43.8
	80 - 89 Gy	1	1.6

Mycological collection from the oral cavity revealed a high rate of opportunistic infection by *Candida* spp. after completion of radiotherapy treatment (71.4%). Highlighting the higher prevalence of *C. tropicalis* (42.9%), the presence of mixed infection by *C. albicans* and *C. parapsilosis*, and the intriguing identification of a case of infection by *C. magnoliae*.

This study suggests statistically significant associations between the type of neoplasm and: age group [$\chi^2(112) = 195,26$; $p < 0,001$; $V = 0,54$], occurrence of recurrence [$\chi^2(14) = 25,51$; $p = 0,03$; $V = 0,55$], treatment plan [$\chi^2(84) = 305,26$; $p < 0,001$; $V = 0,78$], dose of radiotherapy [$\chi^2(60) = 106,73$; $p < 0,001$; $V = 0,52$], and the modality of chemotherapy [$\chi^2(16) = 51,67$; $p < 0,001$; $V = 0,83$] (Table 3).

Table 3. Association between neoplasms and variables: age group, recurrence, type of treatment, dose of radiotherapy and type of chemotherapy.

Variables	Squamous cell carcinoma	Adenocarcinoma	Metastatic melanoma	Adenoid cystic carcinoma	Plasmocytoma	Metastatic carcinoma	Metastatic clear cell carcinoma	Astrocytoma	Glioma	Pituitary adenoma	Pituitary carcinoma	Glioblastoma	Neuroendocrine carcinoma	Linfoma	Undifferentiated
Age range (years)															
0 - 9	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0
20 - 29	1	0	0	0	0	0	0	2*	0	0	0	0	0	0	0

30 - 39	1	0	0	0	0	1*	0	1	0	0	1*	0	0	0	0
40 - 49	3	0	0	0	0	2*	0	1	0	0	0	0	0	0	0
50 - 59	13	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
60 - 69	19	2	2	1	2	0	1	0	0	0	0	0	2	0	0
70 - 79	10	2	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0
80 - 89	3	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
90 - 99	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Inferential values: $\chi^2(112) = 195.26$; $p < 0.001$; $V = 0.54$

Recurrence

Yes	5	0	0	0	0	0	0	2*	1*	0	1*	0	0	0	0
No	47	6	2	2	2	3	1	2	0	2	0	1	2	2	1

Inferential values: $\chi^2(14) = 25.51$; $p = 0.03$; $V = 0.55$

Treatment: Surgery (S), Radiotherapy (R), Chemotherapy (C), and combinations

S	5	0	1	0	0	0	0	0	0	2*	0	0	1	0	1*
R	0	0	1*	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0
Q	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2*	0
S+R	21	1	0	1	0	2	0	2	0	0	0	1	0	0	0
S+Q	0	0	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0
R+Q	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
S+R+Q	26	5	0	0	2	1	0	2	0	0	1	0	1	0	0

Inferential values: $\chi^2(84) = 305.26$; $p < 0.001$; $V = 0.78$

Radiotherapy dose (Gy)

20 - 29	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
30 - 39	3	5*	1*	0	0	2*	0	0	0	0	0	0	0	0	0
40 - 49	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

50 - 59	6	0	0	0	1	1	0	3	1	0	1	1	0	0	0
60 - 69	7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1*	0	0
70 - 79	27*	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80 - 89	0	0	0	1*	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Inferential values: $\chi^2(60) = 106.73$; $p < 0.001$; $V = 0.52$

Type of chemotherapy: Curative (C), Adjuvant (A), Palliative (P)

C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2*	0
A	19*	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
P	5	4*	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0

Inferential values: $\chi^2(16) = 51.67$; $p < 0.001$; $V = 0.83$

Legend: f: gross frequency; χ^2 : Chi-Square Test Statistics; df: degrees of freedom; p: statistical significance; V: Cramer's V association coefficient; * = statistically significant association at the 5% level.

MIC and MFC analyzes demonstrated that EO and EUC have antifungal activity against yeasts resistant to NYS and AMP, with fungicidal potential against the strains studied (Table 4 and 5). Evaluation of the effect of EO and EUC in the presence of sorbitol and ergosterol suggests that their effect is exerted on the fungal plasma membrane (Table 6).

Table 4. MIC and MFC values ($\mu\text{g/mL}$) of EO, AMP and NYS against yeasts.

Yeasts	¹ <i>L. origanoides</i>				² AMP		³ NYS		GC
	MIC	MFC	MFC/MIC	Effect	MIC	MFC	MIC	MFC	
ATCC 14053	128	128	1	Fungicidal	4	8	256	512	+
CA01	64	128	2	Fungicidal	4	8	256	512	+
CA02	64	128	2	Fungicidal	2	16	256	512	+
CA03	64	128	2	Fungicidal	8	8	128	512	+
ATCC 750	32	128	4	Fungicidal	4	8	256	512	+
CT01	256	512	2	Fungicidal	8	8	128	512	+
CT02	256	256	1	Fungicidal	4	8	256	512	+
CT03	256	1024	4	Fungicidal	4	16	128	512	+

CT04	512	128	0.25	Fungicidal	2	8	128	256	+
CT05	256	256	1	Fungicidal	2	8	256	1024	+
CT06	256	128	0,5	Fungicidal	2	8	512	512	+
ATCC 22019	64	128	2	Fungicidal	4	8	512	512	+
CP01	64	128	2	Fungicidal	8	8	128	512	+
CM01	32	128	4	Fungicidal	2	16	256	256	+

GC: Control of microorganism growth in RPMI-1640, DMSO (10%) and Tween 80 (2%), without test substances or antifungals.

¹Cutoff points: fungistatic (MFC/MIC > 4) and fungicide (MFC/MIC ≤ 4) (Siddiqui et al., 2013).

²Cutoff points: AMP MIC ≤ 1 (S); ≥ 1 (R) µg/mL (CLSI, 2017).

³Cutoff points: MIC NYS ≤ 4 (S); 8 – 32 (S-DD); ≥ 64 (R) µg/mL (CLSI, 2017).

Table 5. MIC and MFC values (µg/mL) of EUC, AMP and NYS against yeasts.

Yeasts	¹ <i>Eucaliptol</i>				² AMP		³ NYS		GC
	MIC	MFC	MFC/MIC	Effect	MIC	MFC	MIC	MFC	
ATCC 14053	64	128	2	Fungicidal	4	8	256	512	+
CA01	64	256	4	Fungicidal	4	8	256	512	+
CA02	64	256	4	Fungicidal	2	16	256	512	+
CA03	64	128	2	Fungicidal	8	8	128	512	+
ATCC 750	32	128	4	Fungicidal	4	8	256	512	+
CT01	256	256	1	Fungicidal	8	8	128	512	+
CT02	256	128	0.5	Fungicidal	4	8	256	512	+
CT03	512	128	0.25	Fungicidal	4	16	128	512	+
CT04	64	256	4	Fungicidal	2	8	128	256	+
CT05	64	128	2	Fungicidal	2	8	256	1024	+
CT06	64	128	2	Fungicidal	2	8	512	512	+
ATCC 22019	64	128	2	Fungicidal	4	8	512	512	+
CP01	64	128	2	Fungicidal	8	8	128	512	+
CM01	64	128	2	Fungicidal	2	16	256	256	+

GC: Control of microorganism growth in RPMI-1640, DMSO (10%) and Tween 80 (2%), without test substances or antifungals.

¹Cutoff points: fungistatic (MFC/MIC > 4) and fungicide (MFC/MIC ≤ 4) (Siddiqui et al., 2013).

²Cutoff points: AMP MIC ≤ 1 (S); ≥ 1 (R) µg/mL (CLSI, 2017).

³Cutoff points: MIC NYS ≤ 4 (S); 8 – 32 (S-DD); ≥ 64 (R) µg/mL (CLSI, 2017).

Table 6. Effect of EO and EUC against *C. tropicalis* in the absence and presence of

0.8M sorbitol, and in the absence and presence of ergosterol at 400µg/mL.

Drug	MIC (µg/mL)			
	<i>C. tropicalis</i> CT05		<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	
	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol	Absence of sorbitol	Presence of sorbitol
EO	64	<8	64	<8
EUC	64	<8	64	<8

Drug	MIC (µg/mL)			
	<i>C. tropicalis</i> CT05		<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	
	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol
EO	64	128	64	64
EUC	64	256	64	32
AMP	2	64	4	16

The association with antifungals revealed an additive effect between the EO and AMP, as well as between EUC and NYS, on *C. tropicalis* yeasts (Table 7).

Table 7. Determination of the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) of the association between EO and EUC with NYS and AMP in yeasts of *C. tropicalis*.

Product	Yeasts	FIC _A	FIC _B	FICI (+Nist)	FIC _A	FIC _B	FICI (+AmB)
EO	<i>C. tropicalis</i> CT05	1	0.125	1.125 (I)	0.125	0.5	0.625 (A)
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	2	0.125	2.125 (I)	2	0.25	2.25 (I)
EUC	<i>C. tropicalis</i> CT05	0.125	2	2.125 (I)	1	0.5	1.5 (I)
	<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	0.25	0.5	0.75 (A)	2	0.25	2.25 (I)
Legend: (I) Indifference, (A) Additivity							

Finally, the evaluation of cytotoxicity in human erythrocytes demonstrated

low toxicity in blood cells (Figure 1).

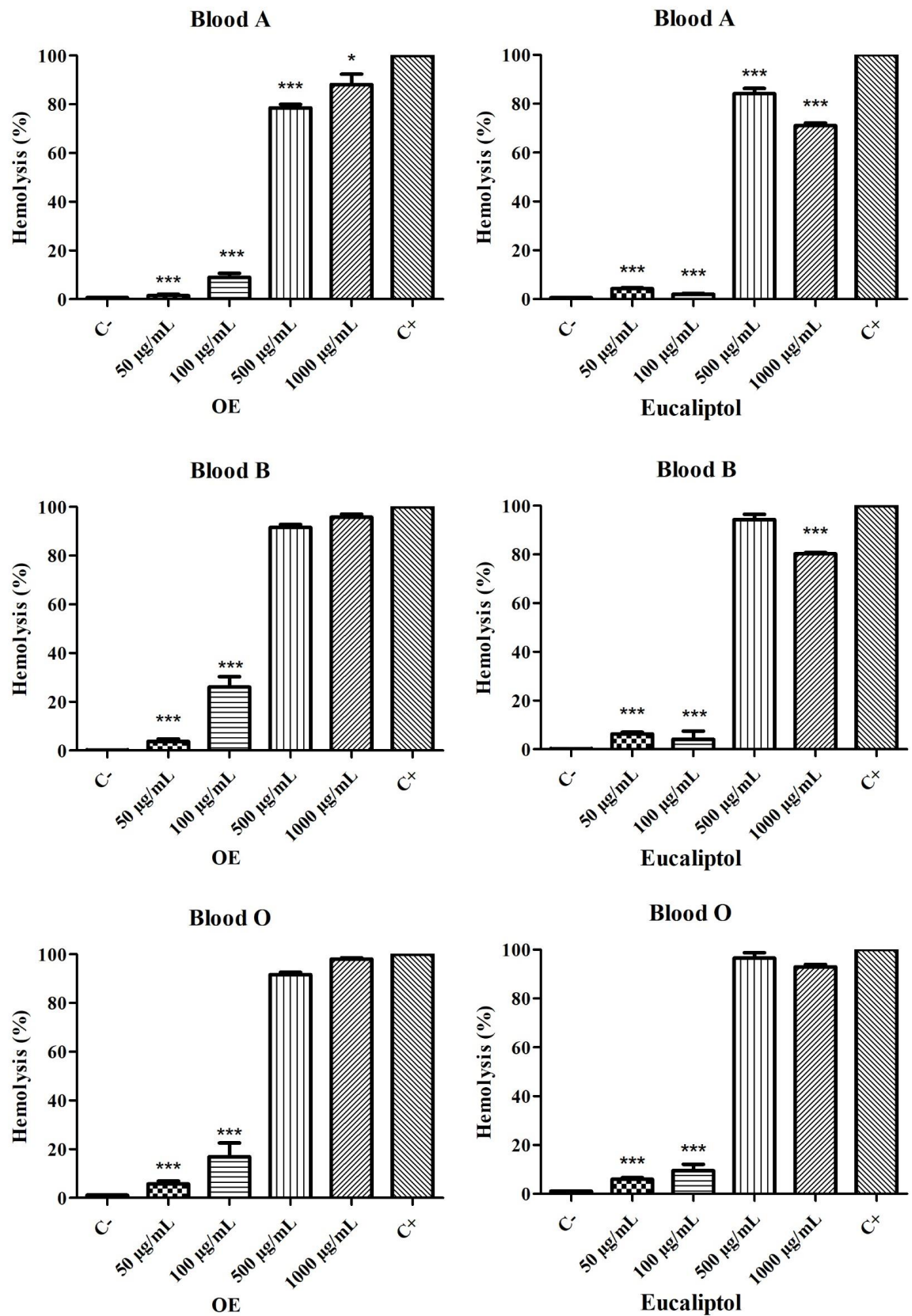


Figure 1. Hemolytic evaluation of EO and EUC in erythrocytes (types A, B, O). (C-) Negative control (0.5% suspension), (C+) Positive control (1% Triton X-100). $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) and $P < 0.001$ (***) versus positive control.

4. Discussion

Research on sociodemographic data, correlated with neoplasms in the head and neck region, points to a tendency towards a higher prevalence in men, Caucasians, who had incomplete primary education, and with an average age that is around 65 years old [31,32]. In contrast, this study demonstrated a higher prevalence for the pheoderma phenotype.

The findings showed a higher prevalence of Squamous Cell Carcinoma, followed by Adenocarcinoma, in line with epidemiological data from North America and Europe [33,34]. A recent study reported a higher occurrence in the oral cavity, without considering non-melanoma skin cancers [35]. However, in this research a greater predominance of cancers of the central nervous system was observed, followed by the oral cavity.

In terms of treatment, there is a clear trend towards the use of combined therapeutic modalities. However, treatment results should be interpreted with caution as individual and institutional biases may influence treatment selection [36,37]. The majority of patients (57.9%) received a dose greater than 60 Gy, with emphasis on doses between 70 and 79 Gy (43.8%). The dose of radiotherapy is directly associated with oral repercussions such as hyposalivation and immunocompromise [38], predisposing factors that may justify the prevalence of oral candidiasis (71.4%) observed in this study.

The prevalence of *C. tropicalis* (43%) differs from the literature, which generally highlights *C. albicans* as the most prevalent species [39-42]. The detection of *C. magnoliae* in one of the research participants is intriguing, given that reports of its infection in humans are rare, with few cases documented in the literature since the first occurrence of systemic infection in 2007 in China [43].

The MIC values obtained allow classifying EO and EUC as substances with

strong antimicrobial activity [44], corroborating findings from the literature [45-48]. Analysis of NYS and AMP MICs demonstrated resistance of all tested yeasts [21]. Comparison of recent studies with previous ones allows observation of the evolution of fungal resistance over the years [49,50]. These findings highlight the relevance of studies for the development of new antimicrobial agents.

The additive effects observed in the associations of OE+AMP and EUC+NYS may contribute to the control of fungal infection. However, combinations between two or more medications must be supported by tests that demonstrate results of the association with the pathogen [51].

Due to the novelty of the evaluation of the effect of EO and EUC against the cell wall of *C. tropicalis*, it was not possible to make a comparison with other studies. However, the findings suggest that EO and EUC act by binding (complexing) with ergosterol from the fungal plasma membrane, a finding also observed in AMP (positive control) [25,26]. More studies are needed to clarify the mechanism of action of OE and EUC, as these products demonstrate significant and promising antifungal properties.

The observation of better interaction between EUC and type A and B red blood cells, also between EO and type A red blood cells, suggests a lower cytotoxic relationship between the molecules of these compounds compared to the antigenic portion of these red cells. Previous study demonstrates the safe use of the aqueous extract of *L. origanoides* for the development of new medicines and for use by populations in traditional medicine [52].

5. Conclusion

Epidemiological findings demonstrate that despite investments in prevention and health promotion, late diagnosis of cancer is still frequent. Late diagnosis provides an increase in the dose of radiotherapy and the combination with chemotherapy, treatments that have adverse effects that are risk factors for oral candidiasis.

The high rate of opportunistic infection by *Candida* spp. and the identification

of fungal resistance, validate the need for studies to develop new antimicrobial agents.

EO and EUC demonstrated significant and promising antifungal properties with action on the fungal plasma membrane, and low blood cell toxicity.

References

1. Zhang, S-Z., Xie, L.& Shang, Z-J. Burden of Oral Cancer on the 10 Most Populous Countries from 1990 to 2019: Estimates from the Global Burden of Disease Study 2019. *Int. J. Environ. Res. Public Health*. **19**, 875; 10.3390/ijerph19020875 (2022).
2. Huang, S-H. & O'Sullivan, B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **18**, e233-40; 10.4317/medoral.18772 (2013).
3. Subash, A., Bylapudi, B., Thakur, S., Rao, V. U. S. Oral cancer in India, a growing problem: Is limiting the exposure to avoidable risk factors the only way to reduce the disease burden?. *Oral Oncology*. **125**, 105677; 10.1016/j.oraloncology.2021.105677 (2022)
4. Brook, I. Late side effects of radiation treatment for head and neck cancer. *Radiat Oncol J*. **38**, 84-92; 10.3857/roj.2020.00213 (2020)
5. Chen, S-C. Oral dysfunction in patients with head and neck cancer: A systematic review. *The Journal of Nursing Research*. **27**, e58; 10.1097/jnr.0000000000000363 (2019).
6. Vila, T., Sultan, A. S., Montelongo-Jauregui, D. & Jabra-Rizk, M. A. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J. Fungi*. **6**, 15; 10.3390/jof6010015 (2020).
7. Cavaleiro, M. & Teixeira, M. C. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front. Med*. **5**, 28; 10.3389/fmed.2018.00028 (2018).
8. Chitapanarux, I., et al. An underestimated pitfall of oral candidiasis in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy: an observation study. *BMC Oral Health*. **21**, 353; 10.1186/s12903-021-01721-x (2021).
9. Vázquez-Olvera, R., Volkow, P., Velázquez-Acosta, C. & Cornejo-Juárez, P.

- Candida bloodstream infection in patients with cancer: A retrospective analysis of an 11-year period. *Revista Iberoamericana de Micología*. **40**, 3–9; 10.1016/j.riam.2022.12.002 (2023).
10. Quindós, G., et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **24**, e172-80; 10.4317/medoral.22978 (2019).
 11. Bilal, H. et al. Antifungal susceptibility pattern of *Candida* isolated from cutaneous candidiasis patients in eastern Guangdong region: A retrospective study of the past 10 years. *Front. Microbiol.* **13**, 981181; 10.3389/fmicb.2022.981181 (2022).
 12. Badiie, P., Zareifar, S., Haddadi, P., & Jafarian, H. Incidence of Fungal Infections in Pediatric Patients with Hematologic Neoplasms. *Arch Pediatr Infect Dis*. **5**, e41317; 10.5812/pedinfect.41317 (2017).
 13. Brancini, G. T. P., et al. The effects of photodynamic treatment with New methylene blue N on *Candida albicans* proteome. *Photochem. Photobiol. Sci.* **15**, 1503–1513; 10.1039/C6PP00257A (2016)
 14. Marquez, L., & Quave, C. L. Prevalence and Therapeutic Challenges of Fungal Drug Resistance: Role for Plants in Drug Discovery. *Antibiotics*. **9**, 150; 10.3390/antibiotics9040150 (2020).
 15. Ansari, M. A., Fatima, Z., & Hameed, S. Anticandidal Effect and Mechanisms of Monoterpenoid, Perillyl Alcohol against *Candida albicans*. *PLoS ONE*. **11**, e0162465; 10.1371/ journal.pone.0162465 (2016).
 16. Boatto, H. E., et al. *Candida duobushaemulonii*: an emerging rare pathogenic yeast isolated from recurrent vulvovaginal candidiasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. **111**, 407-410; 10.1590/0074-02760160166 (2016).
 17. Hood, J. R., Wilkinson, J. M. & Cavanagh, H. M. A. Evaluation of Common Antibacterial Screening Methods Utilized in Essential Oil Research, *Journal of Essential Oil Research*. **15**, 428-433; 10.1080/10412905.2003.9698631 (2003)
 18. Albuquerque, A. C. L., et al. Plantas medicinais e Produtos Bioativos na Odontologia (ed. EDUEPB). 179 (João Pessoa, 2016).
 19. Cleeland, R. & Squires, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. *Antibiotics in laboratory medicine*. **3**, 739- 787 (1991).
 20. Hadacek, F. & Greger, H. Testing of Antifungal Natural Products:

- Methodologies, Comparability of Results and Assay Choice. *Phytochem. Anal.* **11**, 137–147 (2000).
21. Clinical and Laboratory Standards Institute 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M27-A4. Wayne, PA, USA: CLSI; 2017.
 22. Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*. **7**, 1797–1806 (2008).
 23. Morales, G., Paredes, A., Sierra, P. & Loyola, L. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*. **13**, 790– 794 (2008).
 24. Siddiqui, Z. N., Farooq, F., Musthafa, T. N. M., Ahmad, A. & Khan, A. U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *J Saudi Chem Soc.* **17**, 237–243 (2013).
 25. Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., & Zacchino, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of Natural Products*. **71**, 1720–1725 (2008).
 26. Peixoto, L. R. et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. *Archives of Oral Biology*. **73**, 179-185 (2017).
 27. Odds, F.C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother.* **52**, 1 (2003).
 28. Shin, S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin b. *Arch Pharm Res.* **26**, 389-393 (2003).
 29. Diniz-Neto, H. et al. Antifungal activity of 2- chloro-N-phenylacetamide: a new molecule with fungicidal and antibiofilm activity against fluconazole-resistant *Candida* spp. *Braz J Bio.* **84**, e255080 (2023).
 30. Rangel, M., Malpezzi, E. L., Susini, S. M., & De Freitas, J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*. **35**, 305-309 (1997).
 31. Bonzanini, L. I. L., et al. Clinical and sociodemographic factors that affect the quality of life of survivors of head and neck cancer. *Supportive care in cancer : official journal of the Multinational Association of Supportive Care in Cancer*. **28**, 1941–1950; 10.1007/s00520-019-05008-4 (2020).

32. Canick, J. E., et al. Sociodemographic Differences in Patient-Reported Pain and Pain Management of Patients With Head and Neck Cancer in a Community Oncology Setting. *JCO oncology practice*. **19**, e397–e406.; 10.1200/OP.22.00132 (2023).
33. Cooper, J. S., et al. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head & neck*. **31**, 748–758; 10.1002/hed.21022 (2009).
34. Van Dijk, B. A., et al. Rare cancers of the head and neck area in Europe. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. **48**, 783–796; 10.1016/j.ejca.2011.08.021 (2012).
35. Seedat, J., Coutts, K., & Vlok, E. Epidemiology and demographics of head and neck cancer in Africa: A scoping review. *African journal of primary health care & family medicine*. **15**, e1–e13; 10.4102/phcfm.v15i1.3749 (2023).
36. Rajendra, A., Noronha, V., Joshi, A., Patil, V. M., Menon, N., & Prabhash, K. Palliative chemotherapy in head and neck cancer: balancing between beneficial and adverse effects. *Expert review of anticancer therapy*. **20**, 17–29 (2020).
37. Carvalho, A. L., Nishimoto, I. N., Califano, J. A., & Kowalski, L. P. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *International journal of cancer*. **114**, 806–816; 10.1002/ijc.20740 (2005).
38. Arya, L., & Brizuela, M. Oral Management of Patients Undergoing Radiation Therapy. In *StatPearls*. StatPearls Publishing (2023).
39. Motta, A. L., Almeida, G. M. D., Almeida Júnior, J. N., Burattini, M. N., & Rossi, F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis*. **14**, 441-448 (2010).
40. Jesus, J. S. F., Borges-Paluch, L. R., Cerqueira, T. P. S., Vila Nova, M. X. & Hsie, B. S. Caracterização e ocorrência de Candida em pacientes submetidos a tratamento antineoplásico. *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*. **13**, 114-124 (2015).
41. Bongomin, F., Gago, S., Oladele, R.O. & Denning, D.W. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *J. Fungi*. **3**, 57 (2017).
42. Vieira, J. N., et al. Avaliação da frequência de candida spp. em indivíduos

- hospitalizados e não hospitalizados. *Brazilian Journal of Biology*. **78**, 644-652 (2018).
43. Cascio, G. L. First Case of Bloodstream Infection Due to *Candida magnoliae* in a Chinese Oncological Patient. *Journal of Clinical Microbiology*. **45**, 3470–3473 (2007).
 44. Sartoratto, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. **35**, 275-80 (2004).
 45. Batista, R. S. A., Silva, G. S., Machado, S. E. F., & Vieira, K. V. M. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida* spp. *Agropecuária Técnica*. **34**, 40-49 (2013).
 46. Fontenelle, R. O. S., et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. **59**, 934-940 (2007).
 47. Botelho, M. A., et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. **40**, 349-356 (2007).
 48. Brito, D. I. V., et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. **17**, 836-844 (2015).
 49. Boff, E., et al. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. **41**, 36-40 (2008).
 50. Batista, J. M., Birman, E. G., & Cury, A. E. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. *Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo*. **13**, 343-348 (1999).
 51. de Barros, D. B., et al. Efeito antifúngico de α -pineno isolado e em associação com antifúngicos frente às cepas de *Candida albicans*. *Research, Society and Development*. **11**, e58711427748-e58711427748 (2022).
 52. Camilo, C. J., et al. Analysis toxicity by different methods and anxiolytic effect of the aqueous extract *Lippia sidoides* Cham. *Scientific Reports*. **12**, 20626 (2022).

5. CONSIDERAÇÕES GERAIS

As pesquisas sobre dados sociodemográficos, correlacionados à neoplasias de cabeça e pescoço, apontam uma tendência à maior prevalência em homens, leucodermas, que possuíam ensino fundamental incompleto, e com uma média de idade que gira em torno dos 65 anos (Canick et al., 2023, Bonzanini et al., 2023). Nesta pesquisa, também se observou a maior frequência no sexo masculino, com ensino fundamental incompleto, e com o diagnóstico realizado majoritariamente em pacientes entre 50 e 79 anos, com destaque para a faixa etária compreendida entre 60 e 69 anos. Contudo, em contraste com pesquisas anteriores, prevaleceu o fenótipo feoderma.

O enfrentamento emocional de um paciente com câncer é profundamente impactado pelo sofrimento e pela pressão mental ao lidar com a doença (Guerrero et al., 2011). O uso de crenças religiosas ou espirituais para lidar com problemas e amenizar as consequências emocionais é conhecido como *coping* religioso/espiritual. Esse mecanismo pode ter uma conotação negativa quando o paciente utiliza essas crenças para justificar negligências com a saúde ou substituir tratamentos médicos. No entanto, quando combinado com orientações clínicas, pode ser um estímulo positivo no enfrentamento da doença, contribuindo de maneira benéfica para as funções do corpo através de efeitos psiconeuroimunológicos, regulação da frequência respiratória e cardíaca, além de ajudar na redução do estresse (Panzini, Bandeira, 2007). Ouro e colaboradores (2018) sugerem que o bem-estar religioso e espiritual, na maioria dos casos, proporciona estilo de enfrentamento positivo, influenciando a maneira de lidar com o diagnóstico e a adesão ao tratamento oncológico.

Quando se faz referência à neoplasias de cabeça e pescoço, os estudos apontam uma maior frequência ao Carcinoma de Células Escamosas (CEC). (Alhazzazi, Alghamdi, 2016). Como segunda maior prevalência, os estudos divergem quanto aos continentes, muitas vezes vamos observar que no continente africano o segundo mais frequente é o Linfoma de Burkitt (Basse et al., 2015), na América do Norte e Europa, o Adenocarcinoma (Cooper et al., 2009, Van Dijk et al., 2012), na Ásia, o Carcinoma Anaplásico (Lasrado et al., 2012). Em nosso estudo,

observou-se a maior prevalência de Carcinoma de Células Escamosas, seguido de Adenocarcinoma, em consonância com os dados epidemiológicos da América do Norte e Europa.

Entre os tumores intracranianos, a literatura demonstra uma prevalência maior de glioma (Buffon et al., 2022; Ostrom et al., 2015), relato corroborado pelos achados no nosso estudo, com destaque para o astrocitoma, um glioma de baixo grau.

Ao avaliar as localizações mais prevalentes do câncer em região de cabeça e pescoço, estudo recente destacou a cavidade oral como o sítio de maior ocorrência, sem considerar os cânceres de pele não-melanoma (Seedat et al., 2023), concordando com as estimativas de incidência de câncer no Brasil para o triênio 2023-2025 (Santos et al., 2023). Entretanto, nesta pesquisa observou-se que os cânceres com envolvimento do sistema nervoso central apresentaram maior prevalência, seguido do câncer em cavidade oral.

Em relação ao tratamento, a terapia mais adotada em nosso estudo foi do tipo multimodal, caracterizada pela combinação de cirurgia, radioterapia (RTX) e quimioterapia (QTX), identificada em 46,3% dos casos. Em termos de tratamento, há uma tendência clara para a incorporação de novas técnicas e avanços no tratamento, particularmente com o uso de modalidades terapêuticas combinadas, incluindo cirurgia e radioterapia ou quimioterapia e radioterapia. No entanto, os resultados relativos ao tratamento devem ser interpretados com cautela, uma vez que as mudanças no tratamento também decorrem de vieses individuais e institucionais que influenciam a seleção do tratamento, corroborando com nosso estudo (Carvalho et al., 2005; Rajendra et al., 2020).

Ao analisar os tipos de tratamento de forma individualizada, a literatura demonstra que há uma alta frequência de indicação para cirurgia e radioterapia, adotadas em mais de 75% dos casos, enquanto a quimioterapia é indicada em aproximadamente 50% dos tratamentos de câncer em região de cabeça e pescoço (Silva et al., 2020). Esses dados são corroborados nesta pesquisa, onde foram adotadas a cirurgia em 93,9% dos casos, a radioterapia em 84,1%, e a quimioterapia em 51,2% dos tratamentos. Outrossim, a definição do plano de tratamento depende diretamente do grau de comprometimento da lesão, desta

forma, esses dados refletem que, apesar dos esforços, o diagnóstico do câncer ainda pode ser considerado tardio.

Arya e Brizuela (2023) observaram que os pacientes que receberam uma dose ≤ 54 Gy tiveram uma taxa de falha primária significativamente maior do que aqueles que receberam $> 57,6$ Gy ($p = 0,02$). Neste mesmo estudo ocorreram complicações moderadas a graves do tratamento combinado em 7,1% dos pacientes; estes foram mais frequentes em pacientes que receberam ≥ 63 Gy (Peters, 1993). Em nossa pesquisa, a maioria dos pacientes (57,9%) receberam dose superior a 60 Gy, com destaque para dose entre 70 e 79 Gy (43,8%). A relevância desses dados decorre da associação direta entre a dose de radioterapia e repercussões bucais, como hipossalivação e imunocomprometimento, fatores predisponentes para o desenvolvimento de candidíase oral.

Ao se analisar os dados referentes aos participantes da coleta micológica, pode-se observar que a maioria (64,3%) era composta por mulheres, com idade superior a 50 anos (78,6%), feoderma (71,4%), solteiras (50%), alfabetizadas (50%), e católicas (57,1%). A neoplasia mais prevalente foi o CEC (57,1%), seguido do astrocitoma (21,4%). As localizações mais comuns foram o encéfalo (42,8%), e a laringe (28,6%). Com identificação de linfonodo palpável em 28,6%, e metástase à distância em 14,3%. Todos foram submetidos à tratamento multimodal composto por cirurgia e radioterapia, com associação à quimioterapia em 64,3%. A menor dose de radioterapia adotada foi de 30 Gy (14,3%), e a maior 70 Gy (35,7%). A quimioterapia mais adotada foi monoquimioterapia (35,7%) adjuvante (42,8%). Com relação ao fluxo salivar, a sialometria demonstrou fluxo normal (28,6%), baixo (57,1%) e muito baixo (14,3%). Foram observados sinais clínicos sugestivos de candidíase em 64,3%, com sintomatologia de ardência em 57,1%. Foi observado o uso de prótese por 85,7% dos participantes. Com relação à comorbidades, 42,8% eram hipertensos, e 7,1% diabéticos. Por fim, quanto à hábitos deletérios, 71,4% haviam sido fumantes, 57,1% eram etilistas, e 50% associavam tabaco e álcool.

Este estudo enfatiza a importância da pesquisa sobre microrganismos presentes na cavidade oral de pacientes imunocomprometidos. Cerca de 71,4% dos pacientes que participaram da coleta micológica apresentaram infecção oportunista por *Candida* spp. Isso pode representar um desafio para a saúde

sistêmica desses pacientes, e está de acordo com estudos que indicam uma variação de 10% a 70% de infecção pelo gênero *Candida* em indivíduos saudáveis, números que tendem a ser maiores para os imunocomprometidos (Motta et al., 2010; Sroussi et al., 2017; Vieira, 2018). Além disso, um estudo recente relatou por meio de uma análise de regressão logística que os pacientes com câncer em região de cabeça e pescoço estão associados à níveis mais altos de inflamação gengival e a uma condição de saúde bucal precária em comparação com pacientes com outros tipos de câncer (Nishi et al., 2023). Justificando a maior predisposição deste paciente à infecções oportunistas por *Candida* spp.

Vale ressaltar a prevalência significativa de *C. tropicalis* (43%) entre as espécies do gênero *Candida* isoladas neste estudo, seguida por *C. albicans* (14%), *C. magnoliae* (7%) e uma associação de *C. albicans* com *C. parapsilosis* (7%). Esses resultados divergem da literatura, que geralmente destacam *C. albicans* como a espécie de maior prevalência (Bongomin et al., 2017; Jesus et al., 2015; Motta et al., 2010; Vieira, 2018).

A detecção de *C. magnoliae* em um dos participantes da pesquisa é intrigante, dado que relatos de sua infecção em humanos são raros, com poucos casos documentados na literatura, desde a primeira ocorrência de infecção sistêmica em 2007 na China (Cascio et al., 2007). Contudo, durante anamnese, o paciente relatou apresentar criação de aves, bem como a convivência com a presença de carcarás muito próximos à sua residência. Os carcarás pertencem a uma espécie de ave de rapina da Ordem Falconiformes, Família *Falconidae*, comuns no Nordeste brasileiro. Silva e colaboradores (2019) descrevem a presença dessa levedura em aves de rapina, sugerindo que a infecção possa ter sido provocada pela associação entre o imunocomprometimento do paciente e o seu contato com aves.

Estudos químicos da *L. origanoides* realizados no Brasil e apresentados por Morão et al. (2016) demonstram que a planta possui monoterpenos oxigenados, carvacrol e timol.

A estrutura química do timol e carvacrol lhe conferem potencial antioxidante, permitindo a capacidade destes compostos na proteção ou reversão dos efeitos do H₂O₂ nas células. Dessa forma, justifica-se a função essencial destas moléculas na

proteção contra efeitos oxidativos e menor desempenho de efeito citotóxico, contribuindo para o uso dessas moléculas na ação terapêutica de muitas patologias (Dantas, 2017; Llana-Ruiz-Cabello et al., 2015).

Com relação aos experimentos deste estudo direcionados para a análise da atividade antifúngica, o óleo essencial de *L. origanoides* e eucaliptol apresentaram efeito fungicida (CFM/CIM ≤ 4) (Siddiqui et al., 2013) sobre todas as leveduras testadas (*C. tropicalis*, *C. albicans*, *C. parapsilosis*, e *C. magnoliae*). Além disso, os valores de CIM obtidos permitem classificar o óleo essencial e eucaliptol como substâncias de forte atividade antimicrobiana (Sartoratto et al., 2004), corroborando achados da literatura (Botelho et al., 2007; Batista et al., 2013; Brito et al., 2015; Fontenelle et al., 2007).

A análise das CIMs dos antifúngicos padrões utilizados nesta pesquisa (anfotericina B e nistatina) permitiu se observar que todas as leveduras apresentaram resistência para ambos os antifúngicos, uma vez que os valores obtidos de CIM foram superiores aos pontos de corte (CSLI, 2017). Adicionalmente, a comparação de estudos recentes com estudos antecessores permitem a observação da evolução da resistência fúngica ao longo dos anos (Batista et al., 1999; Boff et al., 2008). Esses achados ressaltam a relevância que deve ser conferida ao incentivo de estudos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos.

Os achados do presente estudo sugerem que a associação de *L. origanoides* e anfotericina B possui benefício quanto aditividade em levedura clínica de *C. tropicalis*, enquanto o eucaliptol em associação com a nistatina também apresentou aditividade sobre a linhagem padrão, podendo auxiliar no controle da infecção fúngica. Entretanto, qualquer decisão de combinar dois ou mais medicamentos devem ser apoiados por testes que demonstrem resultados da associação junto ao patógeno em questão (Barros et al., 2023).

Uma característica distintiva das drogas que atuam inibindo a síntese da parede celular fúngica é que o seu efeito antifúngico é revertido num meio contendo um estabilizador osmótico, tais como o sorbitol (Peixoto et al., 2017). Assim, caso o produto atue de alguma forma sob a parede celular, ele causa a lise das células fúngicas na ausência de um estabilizador osmótico, mas permite seu crescimento

na presença desse suporte osmótico (Escalante et al., 2008; Pristov e Ghannoum, 2019). Este efeito é detectado por um aumento no valor de CIM em meio contendo sorbitol em comparação com o valor da CIM no meio sem o sorbitol (meio padrão) (Svetaz et al., 2007). Devido ao ineditismo da avaliação sobre o efeito da *L. origanoides* e eucaliptol *contra* a parede celular de *C. tropicalis*, tendo em vista o protagonismo dado à *C. albicans*, não foi possível realizar a comparação com outros estudos.

Neste estudo, a *L. origanoides* e eucaliptol testados parecem atuar ao nível de membrana celular pois foi possível observar que o valor da CIM da *L. origanoides* e eucaliptol para *C. tropicalis* clínica aumentou na presença de ergosterol 400µg/mL no meio de cultura, sugerindo que esse produto atua por ligação (complexação) com o ergosterol de membrana, achado também observado na anfotericina B (controle positivo), que tem uma conhecida interação com o ergosterol (Escalante et al., 2008; Peixoto et al., 2017), demonstrando uma CIM maior na presença deste esterol. Desta forma, são necessários mais estudos que venham a esclarecer o mecanismo de ação da *L. origanoides* e eucaliptol, pois esses produtos demonstram propriedades antifúngicas significativas e promissoras.

A variação hemolítica, mesmo que de forma discreta, demonstra uma tendência de melhor interação entre o eucaliptol e as hemácias do tipo A e B; por outro lado, o óleo essencial da *L. origanoides* apresentou para o tipo A. Essa ação sugere menor relação citotóxica das moléculas desses compostos frente a porção antigênica nestas hemácias.

A toxicidade da *L. origanoides* também foi avaliada em peixe-zebra, *Drosophila melanogaster*, células sanguíneas de *Artemia salina*. Na avaliação de células sanguíneas, observou-se que comparando a análise morfológica das células tratadas com extrato de *L. origanoides* e o grupo controle contendo água destilada, não foram observadas alterações na estrutura celular de eritrócitos, demonstrando que diferentes concentrações de extrato aquoso de *L. origanoides* não afetam morfológicamente as células sanguíneas até uma concentração de 1000µg/mL. Os resultados obtidos apoiam o uso seguro do extrato aquoso de *L. origanoides* para o desenvolvimento de novos medicamentos

e para utilização pelas populações na medicina tradicional corroborando, em parte, com nosso estudo (Camilo et al., 2022).

6. CONCLUSÃO

Os achados epidemiológicos demonstram que o perfil sociodemográfico mais prevalente dos pacientes foi para o gênero masculino, com idade superior a 50 anos, feoderma, autodeclarados com estado civil solteiro, com escolaridade de ensino fundamental incompleto, e de religião católica.

O carcinoma de células escamosas foi a patologia mais prevalente, com maior frequência para os tumores intracranianos, seguidos de neoplasia em língua. Apesar do alto número de prontuários com informações incompletas sobre o estadiamento da doença, a proporção de pacientes que apresentaram comprometimento linfático e metástase à distância sugerem o diagnóstico tardio destes pacientes.

Quanto ao tratamento oncológico, os dados compilados demonstram que o plano terapêutico adotado com maior frequência foi do tipo multimodal, composto pela associação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia. O tratamento radioterápico consistiu, majoritariamente em dose superiores a 50 Gy. O tratamento quimioterápico mais adotado foi a poliquimioterapia adjuvante.

A coleta micológica da cavidade oral revelou um alto índice de infecção oportunista por *Candida* spp. após conclusão do tratamento radioterápico. Com destaque para a maior prevalência de *C. tropicalis*. Adicionalmente, a intrigante identificação de *C. magnoliae* demonstra a relevância no impacto clínico proporcionada pelo desenvolvimento de uma anamnese e exame clínico detalhados, bem como a importância da complementação do diagnóstico clínico com o uso de exames complementares, como a identificação e isolamento da levedura.

Este estudo sugere associações estatisticamente significativas entre o tipo de neoplasia e: a faixa etária, a ocorrência de recidiva, o plano de tratamento, a dose de radioterapia, e a modalidade de quimioterapia.

As análises de CIM e CFM demonstraram que o óleo essencial de *L. origanoides* e o eucaliptol possuem atividade antifúngica sobre as leveduras resistentes à nistatina e anfotericina B, com potencial fungicida sobre as linhagens estudadas. Sugerindo que seu efeito seja exercido sobre a membrana plasmática fúngica.

A associação com antifúngicos revelou efeito de aditividade entre o óleo

essencial de *L. origanoides* e a anfotericina B, como também entre o eucaliptol e a nistatina, sobre leveduras de *C. tropicalis*.

Por fim, a avaliação da citotoxicidade em eritrócitos humanos demonstrou baixa toxicidade nas células sanguíneas.

REFERÊNCIAS*

Zhang SZ, Xie L, Shang ZJ. Burden of Oral Cancer on the 10 Most Populous Countries from 1990 to 2019: Estimates from the Global Burden of Disease Study 2019. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Jan 13;19(2):875. doi: 10.3390/ijerph19020875.

Santos MO, Lima FCS, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM, Cancela MC. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Rev. Bras. Cancerol*. 2023;69(1):e-213700.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2021;71(3):209-249.

Santos LRA, Silva MJ, Silva SSP, Alves JVL, Santana BWJ, Mendes ACOH, et al. Perfil Epidemiológico e Aspectos Clinicopatológicos dos Pacientes com Câncer de Cabeça e Pescoço em um Centro de Radioterapia do Agreste Pernambucano. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2023;69(4).

Huang SH, O'Sullivan B. Oral cancer: Current role of radiotherapy and chemotherapy. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 Mar 1;18(2):e233-40. doi: 10.4317/medoral.18772.

Subash A, Bylapudi B, Thakur S, Rao VUS. Oral cancer in India, a growing problem: Is limiting the exposure to avoidable risk factors the only way to reduce the disease burden? *Oral Oncol*. 2022 Feb;125:105677. doi: 10.1016/j.oraloncology.2021.105677.

Brook I. Late side effects of radiation treatment for head and neck cancer. *Radiat Oncol J*. 2020 Jun;38(2):84-92. doi: 10.3857/roj.2020.00213.

Chen SC. Oral Dysfunction in Patients With Head and Neck Cancer: A Systematic Review. *J Nurs Res*. 2019 Dec;27(6):e58. doi: 10.1097/jnr.0000000000000363.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral Candidiasis: A Disease of Opportunity. *J Fungi (Basel)*. 2020 Jan 16;6(1):15. doi: 10.3390/jof6010015.

Cavalheiro M, Teixeira MC. Candida Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Feb 13;5:28. doi: 10.3389/fmed.2018.00028.

Chitapanarux I, Wongsrita S, Sripan P, Kongsupapsiri P, Phakoetsuk P, Chachvarat S, Kittidachanan K. An underestimated pitfall of oral candidiasis in head and neck cancer patients undergoing radiotherapy: an observation study. *BMC Oral Health*. 2021 Jul 16;21(1):353. doi: 10.1186/s12903-021-01721-x.

Geffers C, Gastmeier P. Nosocomial infections and multidrug-resistant organisms in Germany: epidemiological data from KISS (the Hospital Infection Surveillance System). *Dtsch Arztebl Int*. 2011 Feb;108(6):87-93. doi: 10.3238/arztebl.2011.0087.

Wenzel RP, Gennings C. Bloodstream infections due to Candida species in the intensive care unit: identifying especially high-risk patients to determine prevention strategies. *Clin Infect Dis*. 2005 Sep 15;41 Suppl 6:S389-93. doi: 10.1086/430923.

Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate Immunity and Saliva in Candida albicans-mediated Oral Diseases. *J Dent Res*. 2016 Apr;95(4):365-71. doi: 10.1177/0022034515625222.

Badiee P, Zareifar S, Haddadi P, Jafarian H. Incidence of Fungal Infections in Pediatric Patients with Hematologic Neoplasms. *Arch Pediatr Infect Dis*. 2017;5(3):e41317. doi: 10.5812/pedinfect.41317.

Bilal H, Hou B, Shafiq M, Chen X, Shahid MA, Zeng Y. Antifungal susceptibility pattern of Candida isolated from cutaneous candidiasis patients in eastern

Guangdong region: A retrospective study of the past 10 years. *Front Microbiol.* 2022 Aug 5;13:981181. doi: 10.3389/fmicb.2022.981181.

Quindós G, Gil-Alonso S, Marcos-Arias C, Sevillano E, Mateo E, Jauregizar N, Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019 Mar 1;24(2):e172-e180. doi: 10.4317/medoral.22978.

Vázquez-Olvera R, Volkow P, Velázquez-Acosta C, Cornejo-Juárez P. Candida bloodstream infection in patients with cancer: A retrospective analysis of an 11-year period. *Rev Iberoam Micol.* 2023 Jan-Mar;40(1):3-9. doi: 10.1016/j.riam.2022.12.002.

Azizi A, Rezaei M. Prevalence of Candida species in the oral cavity of patients undergoing head and neck radiotherapy. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects.* 2009 Summer;3(3):78-81. doi: 10.5681/joddd.2009.020.

Panghal M, Kaushal V, Kadayan S, Yadav JP. Incidence and risk factors for infection in oral cancer patients undergoing different treatments protocols. *BMC Oral Health.* 2012 Jul 20;12:22. doi: 10.1186/1472-6831-12-22.

Redding SW, Dahiya MC, Kirkpatrick WR, Coco BJ, Patterson TF, Fothergill AW, et al. Candida glabrata is an emerging cause of oropharyngeal candidiasis in patients receiving radiation for head and neck cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004 Jan;97(1):47-52. doi: 10.1016/j.tripleo.2003.09.008.

Suryawanshi H, Ganvir SM, Hazarey VK, Wanjare VS. Oropharyngeal candidosis relative frequency in radiotherapy patient for head and neck cancer. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2012 Jan;16(1):31-7. doi: 10.4103/0973-029X.92970.

Marquez L, Quave CL. Prevalence and Therapeutic Challenges of Fungal Drug Resistance: Role for Plants in Drug Discovery. *Antibiotics (Basel).* 2020 Mar 31;9(4):150. doi: 10.3390/antibiotics9040150.

Brancini GT, Rodrigues GB, Rambaldi MS, Izumi C, Yatsuda AP, Wainwright M, Rosa JC, Braga GÚ. The effects of photodynamic treatment with new methylene blue N on the *Candida albicans* proteome. *Photochem Photobiol Sci*. 2016 Nov 30;15(12):1503-1513. doi: 10.1039/c6pp00257a.

Ansari MA, Fatima Z, Hameed S. Anticandidal Effect and Mechanisms of Monoterpenoid, Perillyl Alcohol against *Candida albicans*. *PLoS One*. 2016 Sep 14;11(9):e0162465. doi: 10.1371/journal.pone.0162465.

Boatto HF, Cavalcanti SD, Del Negro GM, Girão MJ, Francisco EC, Ishida K, Gompertz OF. *Candida duobushaemulonii*: an emerging rare pathogenic yeast isolated from recurrent vulvovaginal candidiasis in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2016 Jun;111(6):407-10. doi: 10.1590/0074-02760160166.

Alexa E, Sumalan RM, Danciu C, Obistioiu D, Negrea M, Poiana MA, et al. Synergistic Antifungal, Allelopathic and Anti-Proliferative Potential of *Salvia officinalis* L., and *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules*. 2018;23(1):16.

Gusmão ICCP, Pithon MM, Santos AE, Silva TS, Sampaio FC. Antibacterial activity of *Lippia sidoides* Cham against periodontopathogens: an in vitro study. *RSD*. 2022;11(7):e3311727141.

Araujo MJC, Camara C, Moraes MM, Born FS. Insecticidal properties and chemical composition of *Piper aduncum* L., *Lippia sidoides* Cham. and *Schinus terebinthifolius* Raddi essential oils against *Plutella xylostella* L. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*. 2020;92 (suppl 1):e20180895.

Schelenz S, Abdallah S, Gray G, Stubbings H, Gow I, Baker P, Hunter PR. Epidemiology of oral yeast colonization and infection in patients with hematological malignancies, head neck and solid tumors. *J Oral Pathol Med*. 2011 Jan;40(1):83-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00937.x.

Alnuaimi AD, Wiesenfeld D, O'Brien-Simpson NM, Reynolds EC, McCullough MJ. Oral Candida colonization in oral cancer patients and its relationship with traditional risk factors of oral cancer: a matched case-control study. *Oral Oncol.* 2015 Feb;51(2):139-45. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.008.

Jahanshiri Z, Manifar S, Moosa H, Asghari-Paskiabi F, Mahmoodzadeh H, Shams-Ghahfarokhi M, et al. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. *J Mycol Med.* 2018 Jun;28(2):361-366. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.01.001.

Diaz PI, Hong BY, Dupuy AK, Choquette L, Thompson A, Salner AL, Schauer PK, Hegde U, Burleson JA, Strausbaugh LD, Peterson DE, Dongari-Bagtzoglou A. Integrated Analysis of Clinical and Microbiome Risk Factors Associated with the Development of Oral Candidiasis during Cancer Chemotherapy. *J Fungi (Basel).* 2019 Jun 13;5(2):49. doi: 10.3390/jof5020049.

Li D, Xia R, Zhang Q, Bai C, Li Z, Zhang P. Evaluation of candidemia in epidemiology and risk factors among cancer patients in a cancer center of China: an 8-year case-control study. *BMC Infect Dis.* 2017 Aug 3;17(1):536. doi: 10.1186/s12879-017-2636-x.

Viscoli C, Girmenia C, Marinus A, Collette L, Martino P, Vandercam B, Doyen C, Lebeau B, Spence D, Krcmery V, De Pauw B, Meunier F. Candidemia in cancer patients: a prospective, multicenter surveillance study by the Invasive Fungal Infection Group (IFIG) of the European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC). *Clin Infect Dis.* 1999 May;28(5):1071-9. doi: 10.1086/514731.

Fang J, Huang B, Ding Z. Efficacy of antifungal drugs in the treatment of oral candidiasis: A Bayesian network meta-analysis. *J Prosthet Dent.* 2021 Feb;125(2):257-265. doi: 10.1016/j.prosdent.2019.12.025.

Kessler SQS, Lang PM, Dal-Pizzol TS, Montagner F. Resistance profiles to antifungal agents in *Candida albicans* isolated from human oral cavities:

systematic review and meta-analysis. Clin Oral Investig. 2022 Nov;26(11):6479-6489. doi: 10.1007/s00784-022-04716-2.

Maheronnaghsh M, Fatahinia M, Dehghan P, Teimoori A. Identification of Candida Species and Antifungal Susceptibility in Cancer Patients with Oral Lesions in Ahvaz, Southern West of Iran. Adv Biomed Res. 2020 Sep 30;9:50. doi: 10.4103/abr.abr_214_19.

Brasil. Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS : *Lippia sidoides* Cham., Verbenaceae (Alecrim-pimenta). Brasília: Ministério da Saúde; 2018. 72p.

Albuquerque ACL, Araújo CRF, Diniz DN, Pereira JV, Pereira MSV, Costa MRM, et al. Plantas medicinais e produtos bioativos na odontologia. 1 ed. João Pessoa: EDUEPB; 2016. 179p.

Carvalho RRC, Laranjeira D, Carvalho-Filho JLS. In vitro activity of essential oils of *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* and their major chemical components against *Thielaviopsis paradoxa*, causal agent of stem bleeding in coconut palms. Química Nova. 2013;6(2):241-4.

Cavalcanti SCH, Niculau EDS, Blank AF, Câmara CAG, Araújo IN, Alves PB. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). Bioresource Technology. 2010;101(2):829-32.

Costa RA, Cavalcante TTA, Melo CTV, Barroso DLA, Melo HM, Aragão FE. Antioxidant and antibacterial activities of essential oil of *Lippia sidoides* against drug-resistant *Staphylococcus aureus* from food. African Journal of Biotechnology. 2018;17(8):232-8.

Farias-Junior PA, Rios MC, Moura TA, Almeida RP, Alves PB, Blank AF, et al. Leishmanicidal activity of carvacrol-rich essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Biological Research. 2012;45(4):399-402.

Ferreira TDS, Mourão D, Santos GR, Guimarães LDL, Pires ECF, Santos, WF, et al. Fungistatic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. against *Curvularia lunata*. African Journal of Agricultural Research. 2018;13(14):704-13.

Guimarães LGDL, Cardoso MDG, Souza RMD, Zacaroni AB, Santos GRD. Óleo essencial de *Lippia sidoides* nativas de Minas Gerais: composição, estruturas secretoras e atividade antibacteriana. Revista Ciência Agronômica. 2014;45:267-75.

Lima RK, Cardoso MDG, Moraes JC, Carvalho SM, Rodrigues VG, Guimarães LGL. Chemical composition and fumigant effect of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. and monoterpenes against *Tenebrio molitor* (L.) (Coleoptera: Tenebrionidae). Ciência e Agrotecnologia. 2011;35:664-71.

Lima GPG, Souza TM, Freire GP, Farias DF, Cunha AP, Ricardo NMPS, et al. Further insecticidal activities of essential oils from *Lippia sidoides* and *Croton* species against *Aedes aegypti* L. Parasitology Research. 2013;112:1953-8.

Majolo C, Pilarski F, Chaves FCM, Bizzo HR, Chagas EC. Antimicrobial activity of some essential oils against *Streptococcus agalactiae*, an important pathogen for fish farming in Brazil. Journal of Essential Oil Research. 2018;30(5):388-97.

Marco CA, Teixeira E, Simplício A, Oliveira C, Costa J, Feitosa J. Chemical composition and allelopathic activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Chilean journal of agricultural research. 2012;72(1):157-60.

Morais SRD, Oliveira TLS, Bara MTF, Conceição ECD, Rezende MH, Ferri PH, et al. Chemical constituents of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) leaves cultivated in Hidrolândia, Goiás, Brazil. International Journal of Analytical Chemistry, 2012.

Mota ML, Lobo LTC, Costa JMG, Costa LS, Rocha HA, Silva, LFR, et al. In vitro and in vivo antimalarial activity of essential oils and chemical components from three medicinal plants found in northeastern Brazil. *Planta Medica*. 2012;78(7):658-64.

Veras HN, Araruna MK, Costa JG, Coutinho HD, Kerntopf MR, Botelho MA, et al. Topical antiinflammatory activity of essential oil of *Lippia sidoides* Cham: possible mechanism of action. *Phytotherapy research*. 2013;27(2):179-85.

Franco CS. Avaliação da composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Lippia gracilis* e *Lippia origanoides* da Amazônia oriental [dissertação]. Belém: Universidade Federal do Pará; 2012. 49p.

Matos FJA. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária; 2007. 394 p.

Matos FJA, Oliveira F. *Lippia sidoides* Cham. – Farmacognosia, química e farmacologia. *Revista Brasileira de Farmácia*. 1998;79:84-87.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, DAF/SCTIE/MS, Brasília: ANVISA. 2009.

Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira, Brasília: ANVISA. 2011.

Fontenelle RO, Morais SM, Brito EH, Kerntopf MR, Brilhante RS, Cordeiro RA, et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *J Antimicrob Chemother*. 2007 May;59(5):934-40. doi: 10.1093/jac/dkm066.

Sartoratto A., Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35:275-280.

Botelho MA, Nogueira NA, Bastos GM, Fonseca SG, Lemos TL, Matos FJ, et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz J Med Biol Res.* 2007 Mar;40(3):349-56. doi: 10.1590/s0100-879x2007000300010.

Farias EMFG, Ximenes RM, Magalhães LPM, Chiappeta AA, Sena KXFR, Albuquerque JFC. Antifungal activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) against clinical isolates of *Candida* species. *Journal of Herbal Medicine.* 2012;2(3), 63-67.

Rodrigues IS, Tavares VN, Pereira SL, Costa FN. Antiplatelet and antigingivitis effect of *Lippia Sidoides*: a double-blind clinical study in humans. *J Appl Oral Sci.* 2009 Sep-Oct;17(5):404-7. doi: 10.1590/s1678-77572009000500010.

de Moraes SR, Oliveira TL, de Oliveira LP, Tresvenzol LM, da Conceição EC, Rezende MH, et al. Essential Oil Composition, Antimicrobial and Pharmacological Activities of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) From São Gonçalo do Abaeté, Minas Gerais, Brazil. *Pharmacogn Mag.* 2016 Oct-Dec;12(48):262-270. doi: 10.4103/0973-1296.192197.

Brito DIV, Moraes-Braga MFB, Cunha FAB, Albuquerque RS, Carneiro JNP, Lima MSF, et al. Análise fitoquímica e atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *Lippia sidoides* Cham. e do Timol contra cepas de *Candida* spp. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 2015;17:836-844.

Balhim I, Tonani L, von Zeska Kress MR, Oliveira WP. *Lippia sidoides* essential oil encapsulated in lipid nanosystem as an anti-*Candida* agent. *Industrial Crops and Products.* 2019;127:73-81.

Fernandes LP, Turatti IC, Lopes NP, Ferreira JC, Candido RC, Oliveira WP. Volatile retention and antifungal properties of spray-dried microparticles of *Lippia sidoides* essential oil. *Drying Technology.* 2008;26(12):1534-1542.

Hood JR, Wilkinson JM, Cavanagh HM. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *Journal of Essential Oil Research*. 2003;15(6):428-433.

Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. In: Lorian, VMD. *Antibiotics in laboratory medicine*. 3 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1991, p. 739-88.

Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*. 2000;11(3):137-147.

Clinical and Laboratory Standards Institute 2017. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. M27-A4. Wayne, PA, USA: CLSI; 2017.

Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7:1797–1806.

Morales G, Paredes A, Sierra P, Loyola LA. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile. *Molecules*. 2008 Apr 6;13(4):790-4. doi: 10.3390/molecules13040790.

Siddiqui, Z. N., Farooq, F., Musthafa, T. M., Ahmad, A., & Khan, A. U. (2013). Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, 17(2), 237-243.

Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod*. 2008 Oct;71(10):1720-5. doi: 10.1021/np070660i.

Peixoto LR, Rosalen PL, Ferreira GL, Freires IA, de Carvalho FG, Castellano LR, et al. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis*

Linnaeus essential oil against *Candida* spp. Arch Oral Biol. 2017 Jan;73:179-185. doi: 10.1016/j.archoralbio.2016.10.013.

Bonapace CR, Bosso JA, Friedrich LV, White RL. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. Diagn Microbiol Infect Dis. 2002 Dec;44(4):363-6. doi: 10.1016/s0732-8893(02)00473-x.

European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). EUCAST Definitive Document E.Def 1.2, May 2000: Terminology relating to methods for the determination of susceptibility of bacteria to antimicrobial agents. Clin Microbiol Infect. 2000 Sep;6(9):503-8. doi: 10.1046/j.1469-0691.2000.00149.x.

Wu J, Gan C, Li J, Liu Y, Chen Z, Zhang Y, et al. Species Diversity and Antifungal Susceptibilities of Oral Yeasts from Patients with Head and Neck Cancer. Infect Drug Resist. 2021 Jun 18;14:2279-2288. doi: 10.2147/IDR.S316368.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. J Antimicrob Chemother. 2003 Jul;52(1):1. doi: 10.1093/jac/dkg301.

Shin S. Anti-*Aspergillus* activities of plant essential oils and their combination effects with ketoconazole or amphotericin B. Arch Pharm Res. 2003 May;26(5):389-93. doi: 10.1007/BF02976696.

Silva D, Diniz-Neto H, Cordeiro L, Silva-Neta M, Silva S, Andrade-Júnior F, et al. (R)-(+)- β -Citronellol and (S)-(-)- β -Citronellol in Combination with Amphotericin B against *Candida* Spp. Int J Mol Sci. 2020 Mar 5;21(5):1785. doi: 10.3390/ijms21051785.

Rangel M, Malpezzi EL, Susini SM, de Freitas JC. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. Toxicon. 1997 Feb;35(2):305-9. doi: 10.1016/s0041-0101(96)00148-1.

Bonzanini LIL, Soldera EB, Ortigara GB, Schulz RE, Antoniazzi RP, Ardenghi TM, Ferrazzo KL. Clinical and sociodemographic factors that affect the quality of life of survivors of head and neck cancer. *Support Care Cancer*. 2020 Apr;28(4):1941-1950. doi: 10.1007/s00520-019-05008-4.

Canick JE, Bhardwaj A, Patel A, Kuziez D, Larsen R, Misra S, et al. Sociodemographic Differences in Patient-Reported Pain and Pain Management of Patients With Head and Neck Cancer in a Community Oncology Setting. *JCO Oncol Pract*. 2023 Mar;19(3):e397-e406. doi: 10.1200/OP.22.00132.

Guerrero GP, Zago MMF, Sawada NO, Pinto MH. Relationship between spirituality and cancer: patient's perspective. *Rev Bras Enferm*. 2011; 64(1): 53-59.

Panzini RG, Bandeira DR. Coping (enfrentamento) religioso/espiritual. *Rev. psiquiatr. clín*. 2007; 34(Suppl 1): 126-135.

Ouro GC, Sodré BC, Figueiredo EGC, Souto LAD, Fernandes MTT, Fernandes MT. Análise da influência da fé, espiritualidade e religião no prognóstico de pacientes com câncer. *Revista Saúde e Ciência Online*. 2018;7(2):125-132.

Alhazzazi T, Alghamdi F. Câncer de cabeça e pescoço na Arábia Saudita, uma revisão sistemática Uma revisão sistemática e atualizações. *Jornal Asiático-Pacífico de Prevenção do Câncer*. 2016;17(8):4043-4048.

Bassey GO, Osunde OD, Anyanechi CE. Analysis of 46 cases of malignant jaw tumours in Calabar, Nigeria. *Niger Med J*. 2015 Jul-Aug;56(4):240-3. doi: 10.4103/0300-1652.169696.

Cooper JS, Porter K, Mallin K, Hoffman HT, Weber RS, Ang KK, Gay EG, Langer CJ. National Cancer Database report on cancer of the head and neck: 10-year update. *Head Neck*. 2009 Jun;31(6):748-58. doi: 10.1002/hed.21022.

Van Dijk BA, Gatta G, Capocaccia R, Pierannunzio D, Strojan P, Licitra L; RARECARE Working Group. Rare cancers of the head and neck area in Europe. *Eur J Cancer*. 2012 Apr;48(6):783-96. doi: 10.1016/j.ejca.2011.08.021.

Lasrado S, Prabhu P, Kakria A, Kanchan T, Pant S, Sathian B, Gangadharan P, Binu V, Arathisenthil S, Jeergal PA, Luis NA, Menezes RG. Clinicopathological profile of head and neck cancers in the Western development region, Nepal: a 4-year snapshot. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(12):6059-62. doi: 10.7314/apjcp.2012.13.12.6059.

Beltrame, C. M., Takatsuk, J. M., Sobral, A. C. L., Simm, E. B., Buffon, V. A., & Bark, S. A. (2022). PERFIL EPIDEMIOLÓGICO DOS PACIENTES COM TUMORES INTRACRANIANOS PRIMÁRIOS. *Revista Médica do Paraná*, 80(1), 1694-1694.

Ostrom QT, Gittleman H, Stetson L, Virk SM, Barnholtz-Sloan JS. Epidemiology of gliomas. *Cancer Treat Res*. 2015;163:1-14. doi: 10.1007/978-3-319-12048-5_1.

Seedat J, Coutts K, Vlok E. Epidemiology and demographics of head and neck cancer in Africa: A scoping review. *Afr J Prim Health Care Fam Med*. 2023 Aug 1;15(1):e1-e13. doi: 10.4102/phcfm.v15i1.3749.

Santos MO, Lima FCS, Martins LFL, Oliveira JFP, Almeida LM, Cancela MC. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira De Cancerologia*. 2023;69(1):e-213700. doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700.

Carvalho AL, Nishimoto IN, Califano JA, Kowalski LP. Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: a site-specific analysis of the SEER database. *Int J Cancer*. 2005 May 1;114(5):806-16. doi: 10.1002/ijc.20740.

Rajendra A, Noronha V, Joshi A, Patil VM, Menon N, Prabhash K. Palliative chemotherapy in head and neck cancer: balancing between beneficial and

adverse effects. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2020 Jan;20(1):17-29. doi: 10.1080/14737140.2020.1708197.

Silva, FA, Roussenq SC, Tavares, MGS, Souza CPF, Mozzini CB, Benetti M, et al. Epidemiological profile of patients with head and neck cancer at a cancer center in Southern Brazil. *Revista Brasileira de Cancerologia.* 2020;66(1):e-08455. doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2020v66n1.455.

Peters LJ, Goepfert H, Ang KK, Byers RM, Maor MH, Guillaumondegui O, Morrison WH, Weber RS, Garden AS, Frankenthaler RA, et al. Evaluation of the dose for postoperative radiation therapy of head and neck cancer: first report of a prospective randomized trial. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1993 Apr 30;26(1):3-11. doi: 10.1016/0360-3016(93)90167-t.

Arya L, Brizuela M. Oral Management of Patients Undergoing Radiation Therapy. 2023 Mar 19. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2023.

Sroussi HY, Epstein JB, Bensadoun RJ, Saunders DP, Lalla RV, Migliorati CA, Heavilin N, Zumsteg ZS. Common oral complications of head and neck cancer radiation therapy: mucositis, infections, saliva change, fibrosis, sensory dysfunctions, dental caries, periodontal disease, and osteoradionecrosis. *Cancer Med.* 2017 Dec;6(12):2918-2931. doi: 10.1002/cam4.1221.

Motta AL, Almeida GM, Almeida Júnior JN, Burattini MN, Rossi F. Candidemia epidemiology and susceptibility profile in the largest Brazilian teaching hospital complex. *Braz J Infect Dis.* 2010 Sep-Oct;14(5):441-8.

Vieira JN, Feijó AM, Bueno ME, Gonçalves CL, Lund RG, Mendes JF, et al. Avaliação da frequência de candida spp. em indivíduos hospitalizados e não hospitalizados. *Brazilian Journal of Biology.* 2018;78:644-652.

Nishi H, Obayashi T, Ueda T, Ohta K, Shigeishi H, Munenaga S, et al. Pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentam saúde bucal ruim em comparação

com aqueles com outros tipos de câncer. Saúde bucal BMC. 2023;23(1):647. doi: 10.1186/s12903-023-03356-6.

Jesus, JSF, Borges-Paluch LR, Cerqueira, TPS, Vila Nova MX, Hsie BS. Caracterização e ocorrência de Candida em pacientes submetidos a tratamento antineoplásico. Revista da Universidade Vale do Rio Verde. 2015;13:114-124.

Bongomin F, Gago S, Oladele RO, Denning DW. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. J. Fungi. 2017;3:57.

Lo Cascio G, Dalle Carbonare L, Maccacaro L, Caliarì F, Ligozzi M, Lo Cascio V, Fontana R. First case of bloodstream infection due to *Candida magnoliae* in a Chinese oncological patient. J Clin Microbiol. 2007 Oct;45(10):3470-3. doi: 10.1128/JCM.00934-07.

Silva DR, Silva JSA, Ferreira SDS, Farias RC, Lima-Neto RG, Souza-Motta CM, et al. Ocorrência de leveduras na cavidade oral e traqueia de aves de rapina. Medicina Veterinária (UFRPE). 2019; 13(4):485-489.

Morão RP, Almeida AC, Martins ER, Prates JPB, Oliveira FD. Constituintes Químicos e Princípios Farmacológicos do óleo Essencial de Alecrim Pimenta (*Lippia Origanoides*). Revista Unimontes Científica. 2016;18(1):74-81.

Dantas TB. Avaliação da toxicidade e atividade antifúngica in vitro do Timor sobre linhagens de *Penicillium citrinum* [Tese]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba; 2017. 134p.

Llana-Ruiz-Cabello M, Gutiérrez-Praena D, Puerto M, Pichardo S, Jos Á, Cameán AM. In vitro pro-oxidant/antioxidant role of carvacrol, thymol and their mixture in the intestinal Caco-2 cell line. Toxicol In Vitro. 2015 Jun;29(4):647-56. doi: 10.1016/j.tiv.2015.02.006.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology. 2004; 35:275-280.

Batista RSA, Silva GS, Feitosa SE. Atividade antifúngica de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) sobre *Candida* sp. Revista AGROTEC. 2013;34(1):40-49.

Batista JM, Birman EG, Cury AE. Suscetibilidade a antifúngicos de cepas de *Candida albicans* isoladas de pacientes com estomatite protética. Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo. 1999;13:343-348.

Boff E, Lopes PGM, Spader T, Scheid LA, Loreto É, Dal Forno NF, et al. Reavaliação da suscetibilidade de *Candida* à anfotericina B: estudo comparativo com isolados de três hospitais do Estado do Rio Grande do Sul. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2008;41:36-40.

Barros DB, Lima LDO, Silva LA, Fonseca MC, Diniz-Neto H, Rocha WPS, et al. Efeito antifúngico de α -pineno isolado e em associação com antifúngicos frente às cepas de *Candida albicans*. Research, Society and Development. 2022;11(4):e58711427748.

Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. Clin Microbiol Infect. 2019 Jul;25(7):792-798. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.028.

Svetaz L, Agüero MB, Alvarez S, Luna L, Feresin G, Derita M, et al. Antifungal activity of *Zuccagnia punctata* Cav.: evidence for the mechanism of action. Planta Med. 2007 Aug;73(10):1074-80. doi: 10.1055/s-2007-981561.

Camilo CJ, Leite DOD, Mendes JWS, Dantas AR, Carvalho NKG, Castro JWG, et al. Analysis toxicity by different methods and anxiolytic effect of the aqueous extract *Lippia sidoides* Cham. Sci Rep. 2022 Nov 30;12(1):20626. doi: 10.1038/s41598-022-23999-9.

* De acordo com as normas do PPGO/UFPB, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* - Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o *Medline*.

APÊNDICE 1

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Título do Projeto: **"Avaliação antifúngica do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth, sobre espécies de *Candida* isoladas de pacientes em tratamento oncológico"**

Pesquisador Responsável: **Daniel Furtado Silva**

Orientador: **Edeltrudes de Oliveira Lima**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Estamos realizando um estudo com o objetivo de identificar os micro-organismos do gênero *Candida* presente nos indivíduos em quimioterapia e avaliar a sensibilidade dos mesmos frente a substâncias-teste. Esta pesquisa se justifica pela necessidade de terapia alternativa no tratamento de infecções por *Candida* na cavidade bucal devido a inconvenientes encontrados nos produtos alopáticos como alto custo, ineficiência de alguns produtos sintéticos e agressividade ao organismo humano. Espera-se que, a partir dos resultados deste estudo, haja o aumento do interesse pelo desenvolvimento de produtos alternativos com potencial aplicabilidade clínica, visando criar novas estratégias de controle químico das infecções da cavidade bucal por *Candida*, bem como suprir os inconvenientes e fragilidades dos produtos do mercado. Participarão da pesquisa indivíduos que fazem radioterapia, têm idade superior a 18 anos e aceitam participar da pesquisa. As informações serão coletadas por meio de formulários de pesquisa e coleta de material biológico da boca do participante. Informamos que esta pesquisa oferece riscos mínimos a seus participantes, como possível constrangimento provocado pelo exame ou resultado. Para evitar o constrangimento, os participantes serão atendidos individualmente em ambiente reservado para a avaliação clínica, onde será esclarecido o procedimento de coleta e a atenção será prestada de forma individualizada. Os participantes receberão o resultado do exame micológico individualmente em um envelope fechado, durante consulta de retorno, onde todos receberão orientação de higienização oral. Os participantes que apresentarem candidíase bucal receberão o antifúngico padrão Nistatina solução oral 100.000 UI/ml, com as devidas recomendações de uso, e acompanhamento clínico até a resolução da candidíase. Sua participação é voluntária, sendo garantido o direito de desistir da pesquisa, em qualquer tempo, sem que essa decisão o prejudique quanto aos aspectos éticos, morais, financeiros, sociais e de acesso à saúde. Todas as informações obtidas em relação a esse estudo permanecerão em sigilo, assegurando proteção de sua imagem e dos autores dos documentos envolvidos no estudo. Serão respeitados valores morais, culturais, religiosos, sociais e éticos. Os resultados dessa pesquisa poderão ser apresentados em congressos ou publicações científicas, porém sua identidade não será divulgada nestas apresentações, nem serão utilizadas quaisquer imagens ou informações que permitam a sua identificação.

Esperando contar com o seu apoio, desde já agradecemos a sua colaboração.

Contato com o pesquisador responsável:

Caso necessite de maiores informações sobre o presente estudo, favor ligar para o pesquisador Daniel Furtado Silva. Telefone: (83) 99628-2852, Endereço: Rua Cassimiro de Abreu, Brisamar. João Pessoa – PB. CEP: 58030229. E-mail: furtado.ds@gmail.com

Contato com o Comitê de Ética em Pesquisa do CCS/UFPB

Endereço: Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba - 1º andar / Campus I / Cidade Universitária / CEP: 58.051-900. Telefone: (83) 3216 7791. E-mail: eticaccsufpb@hotmail.com

AUTORIZAÇÃO

Após ter sido informado sobre a finalidade da pesquisa **"Avaliação antifúngica do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham, sobre espécies de *Candida* isoladas de pacientes em tratamento oncológico"**, AUTORIZO a utilização dos dados por mim fornecidos.

João Pessoa, ____ de ____ de 202__.

Assinatura do voluntário da pesquisa

Assinatura do Pesquisador Responsável
(Daniel Furtado Silva)

Impressão Datiloscópica



Assinatura da Orientadora da Pesquisa
(Edeltrudes de Oliveira Lima)

APÊNDICE 2

FORMULÁRIO DE DIAGNÓSTICO EPIDEMIOLÓGICO

1. Dados Demográficos

Nome: _____ Contato: _____
Naturalidade: _____ Sexo: (F) (M) Cor de pele: (L) (F) (M)
Idade: _____ Escolaridade: _____ Profissão: _____
Estado civil: _____ Religião: _____
Renda familiar: () Inferior a 1 sal. mín. () 1 a 3 sal. mín. () 3 a 5 sal. mín. () Superior

2. Dados Terapêuticos

Neoplasia: _____ Região: _____ TNM: _____

2.1 Conduta: () Cirurgia: _____

() Radioterapia: Dose/dia: _____ Dias: _____ Dose total: _____

Tipo: _____ Concluído? _____

() Quimioterapia: Medicação: _____ Ciclos: _____

Reações adversas: _____

() Xerostomia () Ardência () Disfagia () Disgeusia () Trismo () Mucosite

3. Dados Clínicos

Fumante: () Sim () Ex () Nunca Etilista: () Sim () Ex () Nunca

Comorbidade: () HAS () DM () Cardio () Nefro () Hepato (): _____

Medicações em uso: _____

Usou antimicrobiano? Qual? _____ Quando? _____

Último TTT odontológico? _____ Motivo: _____

Alteração em mucosa bucal? _____

Candidíase bucal? Localização? _____

Prótese (S/I)? () PT () PPR () PF () PSI () PP Higienização? (S) (N)

Escovação? _____ Colutório? _____ Fluxo salivar? _____

ANEXO 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação Antifúngica do Óleo Essencial de Moringa sobre Espécies de Candida.

Pesquisador: Daniel Furtado Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 45770621.9.0000.5181

Instituição Proponente: Fundação Francisco Mascarenhas/Faculdade Integradas de Patos-FIP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.760.405

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PATOS, 08 de Junho de 2021

Assinado por:
Flaubert Paiva
(Coordenador(a))

ANEXO 2



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso
Cadastro nº A5B93CE

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A5B93CE**
Usuário: **Daniel Furtado Silva**
CPF/CNPJ: **062.737.644-41**
Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
Finalidade do Acesso: **Pesquisa**

Espécie

Lippia origanoides

Título da Atividade: **Avaliação Antifúngica do Óleo Essencial de Lippia origanoides Kunth sobre Espécies de Candida.**

Equipe

Daniel Furtado Silva	INDEPENDENTE
Edeltrudes de Oliveira Lima	Universidade Federal da Paraíba
Ana Carolina Lyra de Albuquerque	Universidade Federal da Paraíba
Abrahão Alves de Oliveira Filho	Universidade Federal de Campina Grande

Data do Cadastro: **17/11/2023 11:20:05**
Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **13:06 de 17/11/2023.**



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
ASSOCIADO - **SISGEN**