

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

ATIVIDADE ANTIFUNGICA E ANTIBIOFILME DO OLÉO ESSENCIAL DE PATCHOULI  
(*Pogostemon cablin*) FRENTE A ISOLADOS DE *Candida albicans*

ALÉXIA ARAÚJO ALENCAR

SAPIENTIA ÆDIFICAT

JOÃO PESSOA-PB

2025

**ALÉXIA ARAÚJO ALENCAR**

**ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI  
(*Pogostemon cablin*) FRENTE A ISOLADOS DE *Candida albicans***

**ANTI-FUNGAL AND ANTI-BIOFILM ACTIVITY OF PATCHOULI  
ESSENTIAL OIL (*Pogostemon cablin*) AGAINST ISOLATES OF *Candida*  
*albicans***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas

Orientador: Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano

Coorientador: Prof. Dr. Felipe Queiroga Sarmento Guerra

**JOÃO PESSOA-PB**

**2025**

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

## Catalogação na publicação Seção de Catalogação e Classificação

A368a Alencar, Aléxia Araújo.

Atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin*) frente a isolados de *Candida albicans* / Aléxia Araújo Alencar. - João Pessoa, 2025.

58 f. : il.

Orientação: Lúcio Roberto Cançado Castellano.

Coorientação: Felipe Queiroga Sarmento Guerra.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais - Odontologia. 2. Agente antifúngico. 3. *Candida albicans*. 4. Candidíase oral. 5. Fitoquímicos. 6. *Pogostemon cablin*. I. Castellano, Lúcio Roberto Cançado. II. Guerra, Felipe Queiroga Sarmento. III. Título.

UFPB/BC

CDU 547.9:616.314(043)

Elaborado por Larissa Silva Oliveira de Mesquita - CRB-15/746

### Informações Complementares:

Título em outro idioma: Anti-fungal and Anti-biofilm activity of patchouli essential oil (*Pogostemon cablin*) against isolates of *Candida albicans*

Palavras-chave em outro idioma: Antifungal agent; *Candida albicans*; Oral candidiasis; Phytochemicals; *Pogostemon cablin*.

Área de concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Produtos Naturais na Odontologia

Banca examinadora: Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano (Orientador - UFPB); Prof. Dr. Walicyranison Plínio da Silva Rocha (Examinador 1 – UFPB); Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Examinador 2 – UFCG).

Data de defesa: 13/01/2025

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

- ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3030-9901>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/2139150775149024>

## **ALÉXIA ARAÚJO ALENCAR**

### **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE PATCHOULI (*Pogostemon cablin*) FRENTE A ISOLADOS DE *Candida albicans***

A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a Defesa de Dissertação apresentada em sessão pública no dia 13 de janeiro de 2025 e atribuiu o conceito APROVADO(A)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** LUCIO ROBERTO CANCADO CASTELLANO  
Data: 11/02/2025 10:15:15-0300  
Verifique em <https://validar.itii.gov.br>

---

**Prof. Dr. Lúcio Roberto Cançado Castellano  
Orientador - UFPB**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** FELIPE QUEIROGA SARMENTO GUERRA  
Data: 11/02/2025 14:25:04-0300  
Verifique em <https://validar.itii.gov.br>

---

**Prof. Dr. Dr. Felipe Queiroga Sarmento  
Coorientador - UFPB**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** WALICYRANISON PLÍNIO DA SILVA ROCHA  
Data: 11/02/2025 10:29:32-0300  
Verifique em <https://validar.itii.gov.br>

---

**Prof. Dr. Walicyranison Plínio da Silva Rocha  
Examinador – UFPB**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** ABRAHAO ALVES DE OLIVEIRA FILHO  
Data: 11/02/2025 18:08:04-0300  
Verifique em <https://validar.itii.gov.br>

---

**Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho  
Examinador - UFCG**

## RESUMO

A espécie *Candida albicans* integra a microbiota humana e é associada a diferentes tipos de infecções, sendo a levedura mais comumente isolada em amostras de infecções da cavidade oral. O número de infecções atribuídas ao gênero *Candida* tem apresentado um crescimento significativo em escala global e devido ao uso rigoroso e indevido dos atuais antimicrobianos a resistência antimicrobiana também cresceu. *Pogostemon cablin* Benth., conhecido popularmente como patchouli, é uma erva medicinal de grande relevância, com diversas propriedades farmacológicas relatadas na literatura. Diante disso, este trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antifúngico do óleo essencial de *P. cablin* frente a 11 isolados orais de *Candida albicans* e uma cepa padrão (ATCC90028). A caracterização química do *P. cablin* foi realizada por meio da Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrofotometria de Massa (CG-EM). A análise da atividade antifúngica foi realizada pela técnica de microdiluição para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fungicida mínima (CFM). O mecanismo de ação da possível atividade antifúngica do fitocomplexo em questão foi analisado pelos ensaios de sorbitol e ergosterol. Ademais, fatores de virulência também foram investigados como a capacidade de formação de biofilme e a morfogênese. Foram identificadas 19 moléculas, incluindo álcool de patchouli (15,11%), Δ-Guaieno (9,85%), α-Guaieno (8.06%) e α-Patchouleno (5.03%). O *P. cablin* apresentou valores de CIM e CFM entre 2 e 128 µg/mL para as cepas testadas. Os resultados sugerem que esta atividade ocorre pela complexação dos constituintes do óleo ao ergosterol da membrana fúngica. O óleo essencial reduziu levemente o Índice de Morfologia (IM) das cepas testadas. Para a cepa mais filamentosa, houve uma diminuição significativa no comprimento dos filamentos, de 285,0 µm para 220,5 µm. Na formação de biofilmes, o óleo essencial apresentou redução de 26% a 59% nas concentrações de 4 a 40 µg/mL e na redução de biofilmes formados, os valores variaram de 49% a 68%. O óleo essencial de *P. cablin* apresentou composição química complexa e relevante atividade sobre *C. albicans*, sendo essa atividade considerada fungicida para a maioria das cepas testadas. Sugere-se que essa ação antifúngica acontece pela complexação do óleo essencial ao ergosterol da membrana plasmática fúngica. Ademais, *P. cablin* atuou na formação e redução do biofilme e também exerceu influência sobre a morfogênese de *Candida albicans*.

**Palavras-chave:** Agente Antifúngico; *Candida albicans*; Candidíase oral; Fitoquímicos; *Pogostemon cablin*.

## ABSTRACT

The *Candida albicans* species is part of the human microbiota and is associated with different types of infections. It is the most commonly isolated yeast in samples of oral cavity infections. The number of infections attributed to the *Candida* genus has grown significantly on a global scale and due to the rigorous and improper use of current antimicrobials, antimicrobial resistance has also increased. *Pogostemon cablin* Benth., popularly known as patchouli, is a medicinal herb of great relevance, with several pharmacological properties reported in the literature. The aim of this study was to evaluate the antifungal potential of *P. cablin* essential oil against 11 oral isolates of *Candida albicans* and a standard strain (ATCC90028). The chemical characterization of *P. cablin* was carried out using Gas Chromatography coupled with Mass Spectrophotometry (GC-MS). The antifungal activity was analyzed using the microdilution technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC) and the minimum fungicidal concentration (MFC). The mechanism of action of the possible antifungal activity of the phytocomplex in question was analyzed using the sorbitol and ergosterol assays. In addition, virulence factors were also investigated, such as biofilm formation capacity and morphogenesis. Nineteen molecules were identified, including patchouli alcohol (15.11%), Δ-Guaiene (9.85%), α-Guaiene (8.06%) and α-Patchoulene (5.03%). *P. cablin* showed MIC and MFC values between 2 and 128 µg/mL for the strains tested. The results suggest that this activity occurs through the complexation of the oil's constituents with the ergosterol of the fungal membrane. The essential oil slightly reduced the Morphology Index (MI) of the strains tested. For the most filamentous strain, there was a significant decrease in filament length, from 285.0 µm to 220.5 µm. In the formation of biofilms, the essential oil showed a reduction of 26% to 59% at concentrations of 4 to 40 µg/mL and in the reduction of biofilms formed, the values ranged from 49% to 68%. The essential oil of *P. cablin* showed a complex chemical composition and significant activity on *C. albicans*, which was considered fungicidal for most of the strains tested. It is suggested that this antifungal action is due to the complexation of the essential oil with the ergosterol of the fungal plasma membrane. In addition, *P. cablin* acted on the formation and reduction of biofilm and also exerted an influence on the morphogenesis of *Candida albicans*.

**Keywords:** Antifungal agent; *Candida albicans*; Oral candidiasis; Phytochemicals; *Pogostemon cablin*.

## **LISTA DE FIGURAS**

Figura 1 – Efeito inibitório do óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i> e Fluconazol na formação de biofilmes de uma espécie de <i>Candida</i> .....	34
Figura 2 - Efeito inibitório do óleo essencial de <i>Pogostemon cablin</i> e Fluconazol sobre o biofilme de uma espécie de <i>Candida</i> .....	35

## **LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Composição química do óleo essencial de patchouli por CG-EM.....	29
Tabela 2. Identificação dos componentes em relação a base de dados NIST.....	30
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) e Concentração Fungicida Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de Patchouli ( <i>Pogostemon cablin</i> ) e do Fluconazol sobre <i>C. albicans</i> .....	32
Tabela 4. Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do <i>Pogostemon cablin</i> e antifúngicos controles na ausência e na presença do sorbitol e do ergosterol contra <i>C. albicans</i> ATCC 90028 e <i>C. albicans</i> LBM097.....	33

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Álcool de patchouli
ASD	Ágar Sabouraud Dextrose
<i>C. albicans</i>	<i>Candida albicans</i>
<i>C. glabrata</i>	<i>Candida glabrata</i>
<i>C. parapsilosis</i>	<i>Candida parapsilosis</i>
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
DCF	Departamento de Ciências Farmacêuticas
DMSO	Dimetilsufóxido
mL	Mililitro
OE	Óleo essencial
OEs	Óleos essenciais
<i>P.cablin</i>	<i>Pogostemon cablin</i>
p/v	Peso por volume
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
spp.	Espécies
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
v/v	Volume de soluto/ volume de solução
µg	Micrograma
µg/ml	Micrograma por mililitro
µl	Microlitro

## SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO.....	11
2.0 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS DA CANDIDÍASE.....	14
2.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA CANDIDÍASE.....	16
2.3 USO DE PRODUTOS NATURAIS.....	17
2.3.1 <i>Pogostemon cablin</i> .....	18
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 OBJETIVO GERAL.....	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1 TIPO DE PESQUISA E LOCAL DOS ENSAIOS LABORATORIAIS.....	22
4.2 CEPAS FÚNGICAS.....	22
4.3 MEIOS DE CULTURA.....	22
4.4 SUBSTÂNCIAS.....	22
4.5 PREPARO DO INÓCULO.....	23
4.6 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA.....	23
4.6.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas.....	23
4.7 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS.....	24
4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	24
4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima.....	25
4.7.3 Ação sobre a parede celular fúngica – ensaio com sorbitol .....	25
4.7.4 Ação sobre a membrana celular fúngica – ensaio com ergosterol.....	25
4.7.5 Efeito do <i>P. cablin</i> na adesão do biofilme.....	26
4.7.6 Efeitos do <i>P. cablin</i> na redução do biofilme .....	26
4.7.7 Ensaio da morfogênese.....	27
4.7.8 Medição do comprimento hílico de <i>Candida albicans</i> .....	28
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	28
6. RESULTADOS.....	29
6.1 CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTOFOMETRIA DE MASSAS.....	29
6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM) .....	30
6.3 AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. cablin</i> SOBRE A PAREDE E A MEMBRANA CELULAR FÚNGICAS.....	33
6.4 ENSAIO DA MORFOGÊNESE.....	33
6.5 MEDIÇÃO DO COMPRIMENTO HÍLICO DE <i>Candida albicans</i> .....	34
6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. cablin</i> SOBRE A INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO .....	34
6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>P. cablin</i> SOBRE A REDUÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO.....	35
7. DISCUSSÃO.....	36
8. CONCLUSÃO.....	45
REFERÊNCIAS.....	46

## 1. INTRODUÇÃO

*Candida* spp. estão presentes em membranas mucosas de diversas partes do corpo, incluindo o trato gastrointestinal, a cavidade oral, o nariz, os órgãos reprodutivos e a pele. A espécie *Candida albicans* integra a microbiota humana e é associada a diferentes tipos de infecções, sendo a levedura mais comumente isolada em amostras de infecções da cavidade oral. Essa espécie oportunista possui uma grande adaptabilidade e pode facilmente passar de um organismo comensal a um patógeno (Di Cosola *et al.*, 2021; Pavlova; Sharafutdinov, 2020; Vila *et al.*, 2020).

A candidíase bucal é uma infecção da mucosa oral ocasionada pelas espécies do gênero *Candida*, desequilíbrios na microbiota oral podem favorecer o crescimento dessas espécies e levar ao aparecimento de sintomas clínicos (Lu, 2021; Cannon, 2022). Os fatores que predispõem o desenvolvimento dessa patologia incluem imunossupressão, radioterapia na região da cabeça e pescoço, diabetes e administração prolongada de antibióticos e drogas imunossupressoras (Lu, 2021). Outros fatores locais são o uso de próteses dentárias e a diminuição do fluxo salivar, este desempenha um papel importante na limpeza mecânica, evitando a adesão da *C. albicans* às células epiteliais orais (Ok *et al.*, 2021).

Além da fragilidade do sistema imunológico do indivíduo, outro fator relevante para o desenvolvimento de infecções é a expressão dos fatores de virulência, incluindo a morfogênese. *C. albicans* pode mudar da forma de blastoconídios para hifas, o que desempenha um papel significativo na infecção e progressão da doença, além de facilitar a adesão celular, a penetração através da barreira da mucosa intestinal e a disseminação na corrente sanguínea nos estágios iniciais da infecção (Chow *et al.*, 2021).

A formação de biofilmes também é um processo chave na evasão do sistema imune. Esta é uma característica fundamental na patogênese da *Candida albicans*, visto que a maioria das infecções associadas a essa espécie ocorre devido à formação de biofilmes na superfície do hospedeiro ou em materiais inertes, como implantes e próteses. O biofilme formado apresenta uma estrutura complexa composta por várias formas morfológicas. Essa resistência na estrutura do biofilme é um dos fatores que contribuem para sua virulência e resistência aos tratamentos, resultando em significativa morbidade e mortalidade (Priya; Pandian, 2020; Tsui, Kong, Jabra, 2016).

O número de infecções atribuídas ao gênero *Candida* tem apresentado um crescimento significativo em escala global, resultando em taxas de mortalidade que podem ultrapassar 70% em determinados grupos de pacientes. As espécies *C. albicans*, *C. glabrata* (*Nakaseomyces glabratus*), *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (*Pichia kudriavzevii*) respondem por mais de 90% dos casos de candidíase registrados (Singh; Tóth; Gácser, 2020).

A resistência antimicrobiana foi acelerada durante e após o surto de COVID-19, devido ao uso rigoroso e indevido dos atuais antimicrobianos em indivíduos com risco de infecções secundárias e co-infecções (Lai *et al.*, 2021; Lolie *et al.*, 2021). Neste ínterim, existe uma necessidade urgente de estabelecer novas opções de tratamento, a fim de interceptar a crescente tolerância medicamentosa e controlar as infecções microbianas emergentes (Qadri *et al.*, 2021; Qadri *et al.*, 2022).

Dessa forma, um vasto número de antimicrobianos derivados de produtos naturais tem sido estudados como fonte de novos candidatos a medicamentos contra uma gama de doenças infecciosas humanas (Ye *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2020).

*Pogostemon cablin* Benth., conhecido popularmente como patchouli, ou “Guanghuoxiang” é uma erva medicinal de grande relevância, com um potencial significativo no setor de fragrâncias, além de ser uma componente chave em diversos medicamentos tradicionais chineses. Nos últimos anos, pesquisas experimentais extensivas exploraram as propriedades farmacológicas e os mecanismos de ação do patchouli. Esses estudos apresentaram uma variedade de efeitos benéficos, incluindo atividade antiúlcera péptica, propriedades antimicrobianas, efeito anti-inflamatório, analgésico, ação antioxidante, atividade antitumoral, controle de diabetes, efeito anti-hipertensivo, modulação imunológica, impacto na microbiota intestinal, efeito antiemético, entre outros (Dechayont *et al.*, 2017; Swamy, Sinniah, 2016; Junren *et al.* 2021).

Atualmente, a análise e a pesquisa sobre a composição química do *Pogostemon cablin* concentram-se principalmente no óleo volátil, também conhecido como óleo de patchouli. Vários ingredientes foram relatados, como álcool de patchouli, pogostone, α-guaieno, δ-guaieno, β-cariofileno, trans-cariofileno, α-patchoulene, β-patchoulene e β-elemeno (Wu *et al.* 2019).

Portanto, considerando seu elevado potencial biofarmacológico, o óleo essencial de Patchouli (*P. cablin*), objeto desse estudo, mostra-se como um composto com inegável

potencial biotecnológico a ser explorado. Dessa forma, é imprescindível pesquisar acerca de sua possível propriedade antifúngica, a fim de detalhar sua atividade farmacológica e viabilizar perspectivas de inovação e tecnologia no desenvolvimento de novas drogas, visando assim contornar a resistência aos medicamentos sintéticos comumente utilizados.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 ASPECTOS FISIOPATOLÓGICOS E MICROBIOLÓGICOS DA CANDIDÍASE

A cavidade oral é uma estrutura complexa, composta por diversas áreas que abrigam milhões de microrganismos. Fatores como fragilidade do sistema imunológico, deficiências nutricionais, doenças metabólicas, dietas ricas em açúcar e hábitos inadequados de higiene oral podem influenciar a diversidade do microbiota oral e favorecer a colonização oral por espécies de *Candida* (Le Bars *et al.*, 2022).

*Candida albicans* possui capacidade de mudar de um estado comensal, normalmente inofensivo, para uma forma patogênica em resposta a variações ambientais, tal processo é marcado pela transição morfológica de blastoconídios para hifas. Essa habilidade de adaptação é denominada polimorfismo e é crucial para a sobrevivência e para a capacidade de invasão da *C. albicans*, uma vez que permite uma resposta a diferentes condições no hospedeiro e facilite a infecção (Noble *et al.* 2017; Hanaoka; Domae, 2021).

As pseudohifas e hifas desempenham um papel essencial na adesão à superfície da cavidade oral, essa colonização contribui para a formação de biofilmes, estruturas complexas envoltas por uma matriz extra-celular que favorecem a penetração tecidual e a persistência da infecção (De Aguiar *et al.* 2023). A matriz do biofilme de *C. albicans* contém proteínas, carboidratos, lipídios e ácidos nucleicos. As hifas fúngicas desempenham um papel essencial ao servir como estrutura de suporte e arcabouço para a adesão de outras células de levedura e bactérias, desenvolvendo biofilmes multiespécies (Zarnowski *et al.*, 2014; Kashyap *et al.*, 2024).

*C. albicans* também pode formar biofilmes em infecções nas unhas, em dentes agravando cáries dentárias, superfícies mucosas e nas superfícies de dispositivos médicos, incluindo cateteres e próteses vocais. Essa capacidade de formar biofilmes fez de *C. albicans* uma das principais causas de infecções nosocomiais, que são difíceis de tratar devido à crescente resistência antifúngica (Rodríguez-Cerdeira *et al.* 2019; Du *et al.* 2020).

Entre as espécies de *Candida*, *Candida albicans* destaca-se como a causa mais comum de infecções tanto em mucosas quanto sistêmicas, sendo responsável por aproximadamente 70% das infecções fúngicas em todo o mundo (Morad *et al.* 2018). Nos últimos anos, consolidou-se como a principal fonte de infecções invasivas graves e potencialmente fatais. Mesmo com intervenções terapêuticas antifúngicas, a mortalidade associada a essas infecções continua elevada, alcançando cerca de 40%, principalmente

em ambientes hospitalares, onde pacientes críticos estão mais vulneráveis às complicações (Chen *et al.* 2020; Basmaciyan *et al.* 2019).

Na cavidade oral, a candidíase pode apresentar diferentes formas clínicas, como a candidíase pseudomembranosa, eritematosa, estomatite protética, queilite angular, dentre outras, variando conforme o estado imunológico do paciente e a gravidade da infecção (Sodiqova *et al.* 2023).

A forma mais prevalente é a pseudomembranosa, caracterizada por placas brancas e cremosas, com aparência semelhante à coalhada, localizadas na língua, mucosa bucal, palato e garganta. Essas placas podem ser facilmente removidas, deixando para trás superfícies eritematosas. A candidíase também pode causar rachaduras e fissuras nas comissuras labiais, conhecidas como queilite angular. Essa condição pode ser dolorosa e sangrar (Sodiqova *et al.* 2023).

A candidíase atrófica crônica, ou estomatite protética, apresenta-se clinicamente como eritema variável da mucosa adjacente à prótese, com ou sem petéquias dispersas. Esta caracteriza-se pela inflamação oral mais comum entre usuários de próteses parciais ou totais. Sua prevalência varia de 60 a 70% em pacientes sintomáticos, no entanto pode ser de até 75%, se formem incluídos os assintomáticos (Sivaramakrishnan; Sridharan, 2017; Ribeiro *et al.*, 2019). Apesar do aspecto irritado, a maioria dos doentes não refere sintomatologia dolorosa, entretanto podem ser relatadas sensação de ardor, disgeusia, disfagia e halitose. A presença dessa inflamação prolongada pode levar à progressão para uma infecção sistêmica (Iba *et al.*, 2021).

Em particular, os fatores mais proeminentes associados a estomatite protética são infecções fúngicas causadas por *Candida* spp. e traumas da mucosa oral que ocorrem como resultado de próteses mal adaptadas. Devido à irritação mecânica causada pelo uso de próteses dentárias, a inflamação se desenvolve na área da mucosa oral, o que pode ser uma base ideal para a fixação de microrganismos e surgimento de uma infecção (Perić *et al.* 2024). As superfícies ásperas das próteses representam um ambiente ideal para a adesão e crescimento de microrganismos. A fixação desses pode causar mau hálito e levar ao desenvolvimento da estomatite protética (Liana *et al.*, 2024).

Devido à facilidade com que *Candida* se adere e coloniza próteses dentárias, essa condição é vista como uma infecção biofilme dependente. Estudos indicam que *C. albicans* é encontrada com maior frequência na superfície das próteses do que na mucosa palatina

adjacente. Por isso, o tratamento clínico costuma focar principalmente na remoção do biofilme presente, com o objetivo de evitar uma nova colonização e o retorno da infecção (Sultan *et al.* 2019).

## 2.2 TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DA CANDIDÍASE

Com o aumento da incidência e prevalência de candidíase oral nos últimos anos, o uso de medicamentos antifúngicos também cresceu (Vila *et al.* 2020). O tratamento com antifúngicos tópicos e sistêmicos tem sido indicado de acordo com a gravidade da infecção. Embora sejam prescritas ambas as abordagens, as terapias tópicas costumam ser preferidas, uma vez que apresentam menor risco de toxicidade renal e hepática em comparação com os tratamentos sistêmicos (Cernáková; Rodrigues, 2020).

O tratamento da candidíase, seja em mucosas ou invasiva, conta com um número limitado de opções antifúngicas, divididas em três classes principais: polienos, azóis e equinocandinas. Essa variedade restrita, somada às limitações dos tratamentos existentes, compromete a eficácia no combate às infecções fúngicas. Os principais problemas incluem baixa seletividade, toxicidade elevada e um risco maior de desenvolvimento de resistência aos tratamentos (Spampinato; Leonardi, 2013; Vila *et al.* 2020).

Na odontologia, os antifúngicos são de extrema importância no tratamento da candidíase oral, especialmente aquelas causadas por *Candida albicans*. Antifúngicos como a nistatina e a anfotericina B, ambos pertencentes à classe dos poliênicos, atuam aumentando a permeabilidade da membrana celular dos fungos. Já os azóis, como fluconazol, cetoconazol e miconazol, inibem a enzima responsável pela síntese de ergosterol, um componente essencial para a integridade da membrana fúngica. A escolha desses medicamentos depende da gravidade da infecção, com a nistatina sendo geralmente indicada para tratamentos tópicos e os azóis para infecções sistêmicas (Brandão *et al.*, 2021; Do Prado *et al.*, 2021).

A terapia tópica com nistatina é considerada o pilar central no tratamento da candidíase oral. Isso se deve à sua alta eficácia, baixo custo e menor incidência de efeitos colaterais em comparação aos triazóis e equinocandinas. Esse fármaco possui baixa solubilidade e baixa permeabilidade. Devido à sua baixa permeabilidade, é fracamente absorvido pela pele, mucosas ou trato gastrointestinal, e seu uso terapêutico é restrito ao tratamento de infecções fúngicas por via tópica (Virág *et al.* 2021).

A anfotericina B, por exemplo, é amplamente considerada padrão ouro no tratamento antifúngico, mas sua falta de seletividade resulta em toxicidade elevada, pois tanto células fúngicas quanto humanas são eucarióticas e compartilham processos biológicos similares. De modo geral, vale ressaltar que os azóis também apresentam limitações, podendo apresentar efeito hepatotóxico, interação com outras drogas (já que inibem as enzimas do citocromo P450 de mamíferos), além de desenvolvimento de resistência por algumas cepas (Lee *et al.*, 2020; Santos *et al.*, 2018).

A classe mais recente de antifúngicos, as equinocandinas, como a caspofungina, atua diretamente na parede celular do fungo, ao inibir a enzima  $\beta$ -(1,3)-D-glucana sintase e, consequentemente, a síntese de  $\beta$ -(1,3)-D-glucano, um polissacarídeo presente majoritariamente na parede celular fúngica e que está ausente em células de mamíferos, sendo então mais seletivas. Tal inibição acarreta perda da osmolaridade e da integridade da parede celular, impedindo o brotamento em leveduras e o crescimento de hifas em fungos filamentosos. No entanto, seu uso é restrito a infecções sistêmicas (Nivoix; Ledoux; Herbrecht, 2020; Tortorano *et al.*, 2021).

O aumento de espécies resistentes, *C.albicans* e *Candida não-albicans*, é uma preocupação crescente. Tal fato reforça a urgência em desenvolver novos alvos terapêuticos que possam superar as limitações dos tratamentos antifúngicos atuais (Pristov; Ghannoum, 2019; Vila *et al.* 2020).

Assim, a resistência aos antifúngicos tem se tornado um desafio eminente no tratamento da candidíase oral. Um fator relevante para essa resistência é o uso excessivo de antifúngicos na prática clínica, muitas vezes sem um diagnóstico laboratorial apropriado, o que contribui para o desenvolvimento de resistência medicamentosa (Rabaan *et al.*, 2023).

## 2.3 USO DE PRODUTOS NATURAIS

As plantas medicinais e aromáticas desempenham um papel crucial na medicina tradicional e são amplamente estudadas em pesquisas científicas, visando descobrir compostos mais eficientes e com menor toxicidade. Elas constituem uma fonte abundante de moléculas bioativas, fornecendo substâncias promissoras para o desenvolvimento de tratamentos contra diversas doenças infecciosas (Anand *et al.*, 2019).

Derivados do metabólito secundário das plantas, os óleos essenciais (OEs) geralmente são extraídos de flores, folhas, raízes, frutos ou cascas. Esse processo ocorre por meio de destilação, prensagem a frio ou extração por solvente (Valdivieso-Ugarte *et al.*, 2019; Spisni *et al.*, 2020). Os OEs são líquidos oleosos voláteis compostos principalmente por terpenóides e ácidos fenólicos (Da Silva *et al.*, 2021). Além de compostos voláteis, como fenóis, álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas (Dhifi *et al.*, 2016).

Hodiernamente, os consumidores demonstram um interesse cada vez maior nesses compostos naturais, amplamente aplicados em diferentes contextos. Esse interesse também tem sido acompanhado por diversas indústrias, como a farmacêutica, cosmética e alimentícia, que buscam explorá-los devido às suas notáveis propriedades biológicas, incluindo ações antifúngicas, antibacterianas e antioxidantes (Duarte; Luís; Gallardo, 2022).

Os óleos essenciais são produtos naturais caracterizados por eficácia, segurança, ausência de resistência microbiana, boa tolerância no organismo animal e efeitos colaterais tóxicos mínimos, posicionando-os como alternativas promissoras. Ao contrário de alguns medicamentos químicos, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais resulta do sinergismo de vários componentes trabalhando juntos. A complexidade da composição dos óleos essenciais dificulta o desenvolvimento de resistência microbiana, minimizando esse risco (Hou; Huang, 2024).

Na busca por novos medicamentos, os produtos naturais são extremamente indicados como fontes de novos compostos. Um estudo realizado em 2020, por Newman e Cragg, avaliou todos os medicamentos autorizados pela Food and Drug Administration (FDA) entre janeiro de 1981 e setembro de 2019, revelando que os compostos originados de produtos naturais foram o segundo grupo mais comum nas formulações. Tanto os extratos totais quanto os compostos isolados são objeto de investigação contínua (Duarte; Luís; Gallardo, 2022).

### 2.3.1 *Pogostemon cablin*

Patchouli, pertencente à família Lamiaceae, é uma planta nativa do sudeste asiático e amplamente cultivada em muitas regiões tropicais e subtropicais, incluindo China, Indonésia, Filipinas e Tailândia. Possui grande relevância, sendo usada frequentemente nas indústrias de fragrâncias, com vários benefícios terapêuticos comprovados na literatura científica. Mais de 140 substâncias, incluindo álcoois, terpenoides, flavonoides, ácidos

orgânicos, fitoesteróis, ligninas, aldeídos, alcalóides e glicosídeos foram identificados (Junren *et al.*, 2021; Fatima *et al.*, 2023).

Dentre essas substâncias, o Álcool de Patchouli (AP), é o componente bioativo dominante no óleo extraído das partes aéreas de *P. cablin*. Um sesquiterpeno tricíclico, que vem se mostrando promissor potencial farmacológico, incluindo atividades neuroprotetoras, repelentes de cupins, antivirais, antibacterianas e antifúngicas (Wu *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2021; Pandey *et al.*, 2022).

*Pogostemon cablin*, amplamente empregado na medicina tradicional, é uma planta aromática reconhecida pela produção de óleos essenciais com diversas propriedades terapêuticas. De acordo com Swamy e Sinniah (2016), aproximadamente 90% do óleo essencial é consumido pelas indústrias de aromas e fragrâncias para a fabricação de cosméticos, perfumes, alimentos e outros produtos relacionados à saúde. Suas folhas produzem um óleo aromático muito valorizado na perfumaria e na aromaterapia devido à sua fragrância marcante. Por esse motivo, o óleo é amplamente utilizado na produção de fragrâncias para diversos produtos de saúde, incluindo sabonetes, detergentes, loções corporais e perfumes.

Esse óleo possui características distintas, como um aroma persistente, com notas amadeiradas, canforadas e terrosas (Donelian *et al.*, 2009). O óleo obtido das partes aéreas do patchouli é composto principalmente por álcool de patchouli (AP) (55,7%), α-guaieno (13,1%), α-bulneseno (11,1%) e outros compostos. Já o óleo extraído das raízes tem como principal componente o pogostone (70,2%), com o AP representando apenas 4% (Verma *et al.*, 2019).

Os extratos e compostos principais do óleo essencial de *P. cablin*, como o álcool de patchouli e o pogostone, mostraram eficácia contra uma ampla gama de microrganismos. Esses compostos demonstraram ação antibacteriana significativa contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas, bem como contra diversas espécies de fungos, em especial várias cepas de *C. albicans*. Além disso, o óleo essencial de patchouli apresenta atividade contra algumas espécies virais (Swamy; Sinniah, 2016).

Segundo Lee *et al.* (2020), o álcool de patchouli (AP) é um medicamento vantajoso para a prevenção e tratamento de doenças humanas. Esse sesquiterpeno tricíclico também apresenta diversas aplicações terapêuticas como: efeitos antidepressivo, antinociceptivo, vasorelaxante, proteção pulmonar, proteção cerebral, antiulcerogênica, anticolite, pré-

biótica, anti-inflamatória, anticâncer e atividades protetoras contra doenças metabólicas. Tais estudos ressaltam a importância dos produtos naturais na descoberta de fármacos e a necessidade de explorar ainda mais suas potencialidades.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 GERAL**

- Investigar o potencial antifúngico do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin*) sobre isolados orais de *Candida albicans* utilizando testes *in vitro*.

#### **3.2 ESPECÍFICOS**

- Realizar caracterização fitoquímica do óleo essencial de *P. cablin*;
- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de *P. cablin* frente às cepas de *Candida albicans*;
- Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *P. cablin* frente às cepas de *Candida albicans*;
- Analisar o possível mecanismo de ação do *P. cablin* avaliando sua interação com a parede celular e o ergosterol da membrana plasmática dos fungos;
- Observar a transição de blastoconídios para hifas verdadeiras (morfogênese) em *C. albicans* na presença do *P. cablin*;
- Verificar o comprimento das hifas após indução da morfogênese na presença do *P. cablin*;
- Analisar a formação de biofilme por cepas de *C. albicans* isolados da cavidade oral na presença do *P. cablin*.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 TIPO DE PESQUISA E LOCAL DOS ENSAIOS LABORATORIAIS

Trata-se de um estudo experimental tipo laboratorial, com abordagem indutiva e de natureza quantitativa. Os testes laboratoriais para avaliação da atividade antifúngica foram conduzidos no Laboratório de Micologia pertencente ao Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF) localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) do campus I da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

### 4.2 CEPAS FÚNGICAS

Para este estudo, foram utilizadas cepas de *Candida albicans*, 11 clínicas coletadas de pacientes com candidíase oral e 1 padrão, previamente identificadas e codificadas como: ATCC 90028, LABM 094, LABM 096, LABM 097, LABM 100, LABM 187, LABM 186, LABM 177, LABM 191, LABM 178, LABM 179, LABM 181. Todas as amostras pertencem à micoteca do Laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF/CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). Todas estas linhagens clínicas foram coletadas anteriormente (protocolo CAAE: 43911715.8.0000.5188 e protocolo CAAE: 23611519.6.0000.5292), armazenadas a -20°C em Caldo Sabouraud Dextrose (CDS) (KASVI®, Curitiba, Brasil) suplementado por glicerol (40% v/v), em criotubos (2 mL). Foram utilizadas nos ensaios repiques de 24-48 horas incubadas a 35 ± 2 °C.

### 4.3 MEIOS DE CULTURA

Os meios de cultura utilizados nos experimentos foram Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) (KASVI®, Curitiba, Brasil) e o RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 com L-glutamina e sem bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich®, São Paulo, SP, Brasil), preparados conforme as descrições do fabricante.

### 4.4 SUBSTÂNCIAS

A substância-teste, óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin*), foi adquirida comercialmente na Herbia® (Joinville, Santa Catarina, Brasil). Para realização dos testes farmacológicos, a substância foi preparada no momento do experimento, sendo

emulsionada em DMSO 5% e TWEEN 80 2% e posteriormente diluídas em meio RPMI 1640.

Anfotericina B, caspofungina, fluconazol, ergosterol, tween 80, DMSO foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo, Brasil) e sorbitol (D-sorbitol anidro) (INLAB®, São Paulo, Brasil). Todos serão preparados conforme orientações do fabricante.

#### 4.5 PREPARO DO INÓCULO

As suspensões foram preparadas a partir de culturas recentes semeadas em ASD e incubadas a  $35 \pm 2$  °C durante 24-48 horas. Após a incubação, foi transferido aproximadamente 4-5 colônias (com uma alça estéril) para tubos de ensaio contendo 10 mL de solução salina estéril (NaCl a 0.85 %). As suspensões resultantes foram agitadas durante 15 segundos com o auxílio de um aparelho vortex (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brasil). A turbidez do inóculo final foi normalizada utilizando uma suspensão de sulfato de bário (tubo de 0.5 na escala de McFarland). A concentração final obtida será de  $1-5 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias por mililitros (UFC/mL) (CLSI, 2017; SVETAZ et al., 2010).

#### 4.6 CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

##### 4.6.1 Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

A caracterização dos componentes do óleo essencial de patchouli que foi obtido comercialmente na Herbia ® (Joinville, Santa Catarina, Brasil). foi realizada pelo Cromatógrafo Gasoso acoplado a Espectrômetro de Massas (CG-EM) (Shimadzu QP2010 Ultra, Japão), utilizando o método descrito por Fontes et al. (2023), com adaptações.

A análise foi feita utilizando Hélio como gás de arraste em uma coluna capilar RTX-5MS (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) seguindo os parâmetros a seguir: a temperatura de injeção, 250°C; temperatura da coluna, 40°C; vazão de gás hélio, 2.11 mL/min; o programa de temperatura foi iniciado a 40°C por 2 min seguido de um aumento até 100°C, logo em seguida aumenta a temperatura para 280°C por 12 min. A identificação dos componentes detectados foi realizada através da comparação dos dados de tempo de retenção e espectro de massas com os disponíveis na biblioteca NIST (National Institute of Standards and Technology).

## 4.7 ENSAIOS ANTIMICROBIANOS *IN VITRO*

### 4.7.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A CIM do óleo essencial, bem como do fluconazol (antifúngico padrão) foi determinada pela técnica da microdiluição em caldo. Portanto, serão utilizadas placas de 96 poços estéreis com tampa com fundo em forma de “U” ALAMAR®), seguindo as diretrizes do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2018) com algumas modificações. O OE foi preparado no momento da execução dos testes, diluído em Tween 80 (2%) e água destilada estéril em quantidade suficiente para obter a concentração de 2048 µg/mL. As suspensões do fungo *Candida albicans* foram preparadas em meio RPMI (Roswell Park Memorial Institute) e ajustadas pela equivalência de turbidez para  $10^5$  UFC/mL conforme a Escala padrão de McFarland.

Em cada orifício da placa foram adicionados 100 µL do caldo RPMI-1640 duplamente concentrado. Em seguida 100 µL da solução da substância teste/antifúngico foram dispensadas nas cavidades da primeira linha da placa. Por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 0,5 µg/mL para o OE, e 64 µg/mL a 1 µg/mL para o fluconazol, de modo que na primeira linha da placa se encontrará a maior concentração e na última a menor concentração. Por fim, serão adicionados 10µL do inóculo previamente preparado em todas as cavidades da placa, onde cada coluna refere-se a uma cepa fúngica especificamente.

Paralelamente, foi realizado controle de viabilidade das cepas ensaiadas (100µL do mesmo RPMI-1640 duplamente concentrado e 10µL do inóculo de cada cepa). E para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos agentes emulsificantes utilizados na solubilização do *Pogostemon cablin*, foi feito um controle no qual será colocado nas cavidades 100µL do RPMI-1640, DMSO, tween 80 e 10µL da suspensão fúngica. Um controle de esterilidade do meio de cultura também foi realizado, colocando-se 100µL do RPMI-1640 em cavidades sem a suspensão fúngica.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a  $35 \pm 2$  °C por 24 horas para a realização da leitura. A CIM será definida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico visualmente verificado nos orifícios da placa, quando comparado com o crescimento controle. Os ensaios serão realizados em triplicata.

#### **4.7.2 Determinação da Concentração Fungicida Mínima (CFM)**

A CFM é definida como a menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento visível em meio sólido. Para isso, após a leitura da CIM em 24 horas, alíquotas de 20 µL dos poços correspondentes à CIM, CIMx2 e CIMx4 foram subcultivadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD) e incubadas a 35°C por 24 horas. A leitura foi realizada por observação visual do crescimento fúngico no meio sólido com base na contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A razão CFM/CIM foi calculada para determinar se a substância tem atividade fungistática ( $CFM/CIM \geq 4$ ) ou fungicida ( $CFM/CIM < 4$ ).

Com base na metodologia proposta por Alves et al. (2021), que sugere uma classificação para avaliar o potencial antifúngico de novos compostos com atividade farmacológica contra espécies de *Candida*, a bioatividade dos compostos foi então determinada por meio dos valores de CIM e classificada nas seguintes categorias: (a) bioatividade muito forte ( $CIM < 3,515 \mu\text{g/mL}$ ); (b) bioatividade forte ( $CIM$  entre 3,515 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ); (c) bioatividade moderada ( $CIM$  entre 26 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ); (d) bioatividade fraca ( $CIM$  entre 101 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ); e (e) bioatividade muito fraca ( $CIM$  entre 501 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ ).

#### **4.7.3 Ação sobre a parede celular fúngica - ensaio com sorbitol**

O teste foi realizado através da técnica de microdiluição em caldo, porém o mesmo processo é feito com o RPMI na ausência do sorbitol, e com adição do sorbitol a 0,8M. O aumento do valor da CIM na presença do sorbitol indica que a parede celular é um dos possíveis alvos da substância em estudo (Sousa et al., 2016; Freires et al., 2014).

A caspofungina é o antifúngico mais aplicado como controle positivo para este teste, em concentração inicial de 4  $\mu\text{g/mL}$  (diacetato de caspofungina—Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), devido à sua ação já conhecida sobre a parede celular. Além disso, foram realizados os controles de esterilidade do RPMI 1640 com e sem o sorbitol, e o de viabilidade do inóculo com adição do RPMI 1640 com e sem o sorbitol.

#### **4.7.4 Ação sobre membrana celular fúngica - ensaio com ergosterol**

O teste foi realizado pela técnica da microdiluição em caldo, porém na ausência e com adição do ergosterol 400  $\mu\text{g/mL}$  ao meio de cultura. Alguns agentes antifúngicos agem sobre o ergosterol da membrana plasmática, formando complexos ou inibindo a biossíntese

da membrana. Assim, o aumento da CIM na presença do ergosterol exógeno indicará uma atividade do agente em estudo sobre o ergosterol presente na membrana plasmática fúngica (Sousa *et al.*, 2016). Para o controle, o mesmo procedimento foi executado com o antifúngico anfotericina B, cujo mecanismo de ação é conhecido e envolve sua ligação ao ergosterol presente na membrana fúngica. Além disso, como descritos anteriormente, foram realizados os controles de esterilidade com e sem o ergosterol, e o de viabilidade do inóculo com e sem o ergosterol (Escalante *et al.*, 2008).

#### **4.7.5 Efeito do *P. cablin* na adesão do biofilme**

Foi avaliado no estágio inicial da formação do biofilme, conforme descrito por Plyuta *et al.*, 2013, com adaptações. O inóculo ( $10^6$  UFC-mL) de *C. albicans* ATCC 90028 juntamente com as concentrações de *P. cablin* previamente determinadas pelos valores de CIM (4 µg/mL), CIMx2 (8 µg/mL), CIMx4 (16 µg/mL) e CIMx10 (40 µg/mL), foram adicionadas em placas de 24 poços e incubadas por 48h a 35°C. Após a incubação, as células planctônicas foram cuidadosamente removidas dos poços por meio de enxágue com PBS e secas por 45 minutos. As células aderidas foram então coradas com cristal violeta a 0,4%. Os valores de absorbância foram lidos a 595 nm usando um leitor de plasma. O teste foi realizado em quatro amostras. O biofilme não tratado correspondeu ao controle de crescimento, enquanto os poços com meio de cultura sem a adição do microrganismo são os controles de esterilidade.

#### **4.7.6 Efeitos do *P. cablin* na redução do biofilme**

Alíquotas de 1000 µL do inóculo de *C. albicans* ATCC 90028 contendo aproximadamente  $10^6$  UFC/mL foram transferidas para uma placa de microdiluição de 24 poços e incubadas por 48 horas a 35°C. Os poços foram lavados com solução salina tamponada com fosfato (PBS) para remover as células planctônicas, em seguida foi adicionado um meio novo de cultura. As concentrações de OE *P.cablin* previamente determinadas pelos valores de CIM (4 µg/mL); CIMx2 (8 µg/mL); CIMx4 (16 µg/mL); CIMx10 (40 µg/mL) e Fluconazol (controle positivo) nas concentrações de CIM (2 µg/mL); CIMx2 (4 µg/mL); CIMx4 (8 µg/mL); CIMx10 (20 µg/mL) foram adicionadas aos poços, seguidas de incubação por 48 horas a 35°C. Para a quantificação do biofilme, os poços foram lavados duas vezes com PBS, secos ao ar por 45 minutos e corados com solução de violeta cristal

a 0,4%. Os valores de absorbância foram lidos a 595 nm usando um leitor de placas (DJORDJEVIC; WIEDMANN; MCLANDSBOROUGH, 2002). O ensaio foi realizado em quadruplicata. O biofilme não tratado correspondeu ao controle de crescimento e o meio de cultura sem adição de microrganismos ao controle de esterilidade.

#### 4.7.8 Ensaio da morfogênese

O ensaio de morfogênese foi realizado de acordo com a técnica descrita por Chaves *et al.* 2007 com algumas modificações. As células de *C. albicans* foram cultivadas durante a noite (18 a 24 horas) em meio YPD na presença e na ausência de *P. cablin*. A absorbância do crescimento celular foi medida usando espectrofotometria (600 nm), e a concentração foi padronizada para  $1 \times 10^6$  células/mL.

Para induzir a morfogênese, 30 µL do crescimento padronizado foram inoculados em caldo YPD suplementado com 20% de soro bovino fetal (SFB) (4 mL de YPD líquido, 1 mL de SFB) em tubos e incubados a 37°C por 1 hora, seguidos por mais 2 horas, totalizando 3 horas de incubação.

Ao final do período de 1 hora, uma alíquota de 500 µL da suspensão foi adicionada a tubos eppendorf de 2 mL contendo 500 µL de formalina a 10% para posterior exame microscópico. Os tubos contendo os inóculos foram incubados novamente para completar o período de incubação de 3 horas. Após esse período, uma alíquota de 500 µL foi transferida para tubos eppendorf contendo 500 µL de formalina a 10% e armazenada a 4°C para posterior observação microscópica.

Todas as lâminas foram lidas em triplicata. As lâminas da incubação de 1 hora foram avaliadas por meio da contagem de 100 células por lâmina e da determinação da porcentagem de células que apresentaram formação de tubo germinativo.

Com relação às lâminas das amostras submetidas a 3 horas de incubação, foi calculado o Índice de Morfologia, pois se espera uma maior variabilidade morfológica das células de *C. albicans* após esse período. Portanto, 100 células de *C. albicans* foram contadas em cada lâmina, com as seguintes classificações morfológicas: blastoconídios (células redondas) receberam um valor de IM de 1; células alongadas com diâmetro duas vezes maior que o comprimento receberam IM = 2; células semelhantes a pseudo-hifas receberam IM = 3; e hifas longas e verdadeiras com lados paralelos receberam IM = 4. O Índice de Morfologia (IM) foi determinado usando a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{(IM1x1) + (IM2x2) + (IM3x3) + (IM4x4)}{100}$$

Nesse contexto, valores próximos a um indicam uma população de células esféricas de levedura; valores próximos a quatro indicam uma população de hifas verdadeiras; e valores entre um e quatro sugerem a presença de morfologias variadas ou, predominantemente, pseudo-hifas.

#### 4.7.9 Medição do comprimento hílico de *Candida albicans*

O comprimento da célula de *C. albicans*, especificamente a cepa 97, foi medido após a indução da morfogênese (incubação por 3 horas em YPD + 20% SFB). O software NIS-Elements D foi usado para essa finalidade. Para cada cepa, o comprimento médio de 100 células hifais foi determinado para isolados previamente cultivados na presença ou ausência de *P.cablin*.

### 5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os ensaios para avaliação da atividade antimicrobiana e morfogênese foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes. Foi realizada uma análise estatística descritiva e inferencial utilizando testes adequados através do software GraphPad Prism 9.0, com nível significância de 5%. Os dados foram analisados por ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey em relação ao controle de crescimento.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 CROMATOGRAFIA GASOSA E ESPECTOFOMETRIA DE MASSAS

A partir dos dados obtidos pelo detector, 19 (dezenove) moléculas foram sugeridas, dispostas na Tabela 1, aquelas com maior índice de similaridade com os Bancos de Dados: NIST 2008, NIST 2008+Shimadzu e FFNSC 1.3.

O componente majoritário indicado foi o Terephthalic acid, di(2-ethylhexyl) ester com 35.69% de área considerando 100% dos picos identificados, seguido por patchouli alcohol 15.11%, Δ-Guaiene (9.85%), α-Guaiene (8.06%) e α-Patchoulene (5.03%) comumente encontrados em identificações da composição do óleo essencial de Patchouli.

Componente	TR(min)	Area(%)
β-Patchoulene	11.997	2,88
Seychellene	12.245	0.58
Caryophyllene	12.286	2.05
α-Guaiene	12.389	8.06
Seychellene	12.511	5.50
α-Humulene	12.550	0.43
α-Patchoulene	12.608	5.03
Patchoulene	12.660	0.69
Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-,[1S-(1 α,4 α,7 α)]-	12.693	0.16
β-Selinene	12.793	0.40
Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-Octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-,[1S-(1 α,4 α,7 α)]-	12.850	2.45
Δ-Guaiene	12.905	9.85
α-Maaliene	13.025	0.16
(-)Caryophyllene oxide	13,388	1.34
Viridiflorol	13.940	1.96
Patchouli alcohol	14.069	15.11
Terephthalic acid, di(2-ethylhexyl) ester	19.616	0.61
Terephthalic acid, di(2-ethylhexyl) ester	20.041	35.69
Terephthalic acid, di(2-ethylhexyl) ester	20.179	7.04

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial de patchouli por CG-EM.

Para identificação foi realizada uma comparação dos valores de Índice de Retenção (IR) dos compostos com valores cadastrados na base de dados NIST, como descrito acima.

Na Tabela 2, constatou-se que 6 (seis) componentes tiveram suas identidades confirmadas através desta análise.

Componente	TR (min)	Área (%)	IR (exp)	IR (lit)	Referência
β-Patchoulene	11.991	2.88	1404	1406	Moio, Piombino, et al., 2000
α-Guaiene	12,384	8.06	1461	1456	Hudaib, Grazia Bellardi, et al.,
α-Humulene	12,545	0.43	1483	1474	2001
					Yu, Kim, et al., 2004
α-Patchoulene	12,604	5.03	1492	1486	Gudaityte and Venskutonis
Caryophyllene	12,286	2.05	1446	1440	R.P., 2007
					Cardeal, da Silva, et al., 2006
(-)Caryophyllene oxide	13,384	1.34	1602	1595	Liu J.M., Nan P., et al., 2006

Legenda: TR: tempo de retenção do componente na coluna; IR (exp): Índice de retenção experimental; IR (lit): Índice de retenção da literatura.

**Tabela 2** - Identificação dos componentes em relação a base de dados NIST.

## 6.2 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA (CIM) E CONCENTRAÇÃO FUNGICIDA MÍNIMA (CFM)

Neste estudo, observou-se o efeito antifúngico do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin*) em 12 cepas de *C. albicans*. A Tabela 3 apresenta os valores de CIM e CFM para o *Pogostemon cablin* e o fluconazol, utilizado como fármaco de referência.

O óleo essencial inibiu o crescimento de 11 das 12 cepas de *Candida albicans* (aproximadamente 91,6%) em concentrações de até 4 µg/mL, enquanto uma cepa (aproximadamente 8,4%) foi inibida a uma concentração de 128 µg/mL, esses valores de CIM representam a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo. Para o fluconazol, utilizado como controle nos testes, os valores de CIM variaram entre 0,5 e 8 µg/mL.

Na análise comparativa entre CIM e CFM expressa na tabela 3, observou-se que 5 das 12 cepas ensaiadas apresentaram a CFM quatro vezes superiores à CIM,

caracterizando-se como efeito fungistático e as outras 7, apresentaram valores idênticos de CFM e CIM, demonstrando efeito fungicida, de acordo com os parâmetros estabelecidos por Siddique et al. (2013).

A análise dos resultados da Concentração Fungicida Mínima (CFM) fornece insights importantes sobre a eficácia do óleo essencial contra *Candida albicans*. Essa métrica reflete a menor concentração necessária para eliminar completamente o microrganismo, diferenciando-se da Concentração Inibitória Mínima (CIM), que apenas inibe o crescimento visível.

CEPAS	<i>Pogostemon cablin</i>			Atividade antifúngica	Fluconazol CIM	Controles	
	CIM	CFM	CFM /CIM			*MO	**Est
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	4 µg/mL	>16 µg/mL	>4	Fungistático	2 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 094	4 µg/mL	>16 µg/mL	>4	Fungistático	0,5 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 096	2 µg/mL	>8 µg/mL	>4	Fungistático	0,5 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 097	128 µg/mL	128 µg/mL	1	Fungicida	8 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 100	2 µg/mL	>8 µg/mL	>4	Fungistático	4 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 187	4 µg/mL	4 µg/mL	1	Fungicida	2 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 186	2 µg/mL	>8 µg/mL	>4	Fungistático	1 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 177	2 µg/mL	4 µg/mL	1	Fungicida	4 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 191	4 µg/mL	2 µg/mL	1	Fungicida	2 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 178	2 µg/mL	2 µg/mL	1	Fungicida	4 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 179	2 µg/mL	2 µg/mL	1	Fungicida	4 µg/mL	+	-
<i>C. albicans</i> LABM 181	2 µg/mL	2 µg/mL	1	Fungicida	4 µg/mL	+	-

Legenda: CFM/CIM= Razão CFM sobre CIM; \*MO= controle de viabilidade; \*\*Est= controle de esterilidade; += crescimento do microrganismo; -= ausência de crescimento de microrganismo. expressas em µg/mL. CFM/CIM> 4 significa que é fungistático, <4 significa que é fungicida.

**Tabela 3.** Concentração Inibitória Mínima (µg/mL) e Concentração Fungicida Mínima (µg/mL) do óleo essencial de Patchouli (*Pogostemon cablin*) e do Fluconazol sobre *C. albicans*.

### 6.3 AÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. cablin* SOBRE A PAREDE E A MEMBRANA CELULAR FÚNGICAS

Os ensaios realizados confirmaram o potencial antifúngico do óleo essencial de *P. cablin* e sugerem que seu efeito ocorre por meio da interação com o ergosterol presente na membrana celular fúngica. Isso é evidenciado pelos valores de CIM, que foram maiores na presença do ergosterol exógeno para ambas as cepas ( $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ ) em comparação à sua ausência, 4  $\mu\text{g/mL}$  para a cepa ATCC e 128  $\mu\text{g/mL}$  para a cepa clínica (Tabela 4).

<b>Microrganismos</b>	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> LABM097	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> LABM097	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. albicans</i> LABM097
<b>Substâncias</b>	<b>Controle</b>		<b>+Sorbitol</b>		<b>+Ergosterol</b>	
<i>Pogostemon cablin</i>	4	128	4	128	$\geq 1024$	$\geq 1024$
Anfotericina B	0,125	0,25	-	-	4	4
Caspofungina	0,03	0,06	0,12	0,12	-	-

Legenda: - = não foi testado; +Sorbitol= presença de sorbitol; +Ergosterol= presença de ergosterol;

**Tabela 4.** Valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}$ ) do *Pogostemon cablin* e antifúngicos controles na ausência e na presença do sorbitol e do ergosterol contra *C. albicans* ATCC 90028 e *C. albicans* LBM097.

### 6.4 ENSAIO DA MORFOGÊNESE

O impacto do *Pogostemon cablin* na filimentação de *Candida albicans* foi analisado utilizando soro fetal bovino como e uma temperatura de 37°C como indutores. Após 1 hora de incubação, avaliou-se a capacidade de formação de tubos germinativos. Na ausência do fitocomplexo, a taxa média de formação de tubos germinativos entre as cepas analisadas foi de 94,99%. A presença do composto não resultou em redução significativa dessa capacidade.

Após 3 horas de incubação, foi calculado o Índice de Morfologia (IM), uma vez que diferentes formas morfológicas são mais evidentes nesse período. Na cepa ATCC, observou-se o predomínio de hifas verdadeiras em condições sem o *P. cablin*, com um IM

médio de 2,61 entre as cepas avaliadas. Contudo, na presença do composto, o predomínio mudou para pseudo-hifas, reduzindo o IM para 2,51.

A cepa 97 apresentou alta capacidade filamentosa, com um IM de 3,42, caracterizando-se pela formação de hifas longas e verdadeiras, além de pseudo-hifas, enquanto blastoconídios eram raros. Na presença do óleo essencial, o Índice de Morfologia dessa cepa reduziu levemente para 3,38.

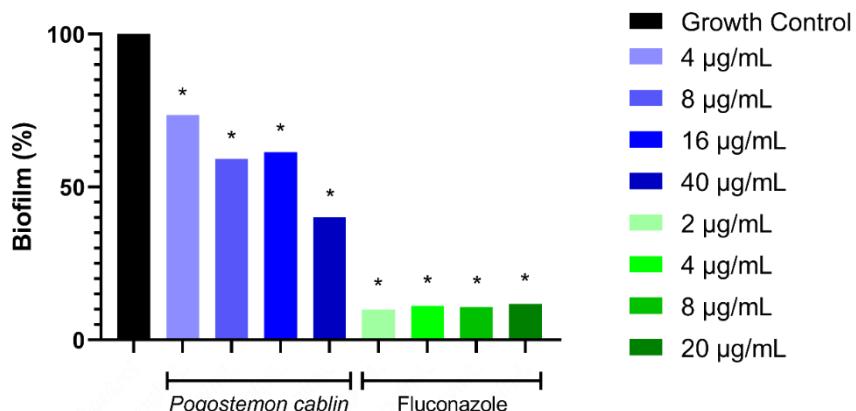
## 6.5 MEDAÇÃO DO COMPRIMENTO HÍFICO DE *Candida albicans*

Após a análise dos resultados obtidos na etapa de morfogênese em meio líquido (3 horas), constatou-se que a cepa 97 apresentava uma capacidade de filimentação superior às demais. Na presença da substância testada, observou-se uma redução no comprimento dos filamentos. A cepa 97 foi escolhida para medições detalhadas utilizando um microscópio óptico e o software NIS-Elements D (Eclipse Ci, Nikon, Japão).

Em condições sem a presença do OE de *P.cablin*, as hifas analisadas apresentaram um comprimento médio geral de 285,0 micrômetros. No entanto, na presença de OE estudado, esse comprimento reduziu significativamente ( $p<0,0001$ ) para 220,5 micrômetros.

## 6.6 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. cablin* SOBRE A INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO

Os resultados da atividade antimicrobiana sobre a inibição da formação do biofilme fúngico do óleo essencial de *Pogostemon cablin* e fluconazol estão expressos na Figura 1.

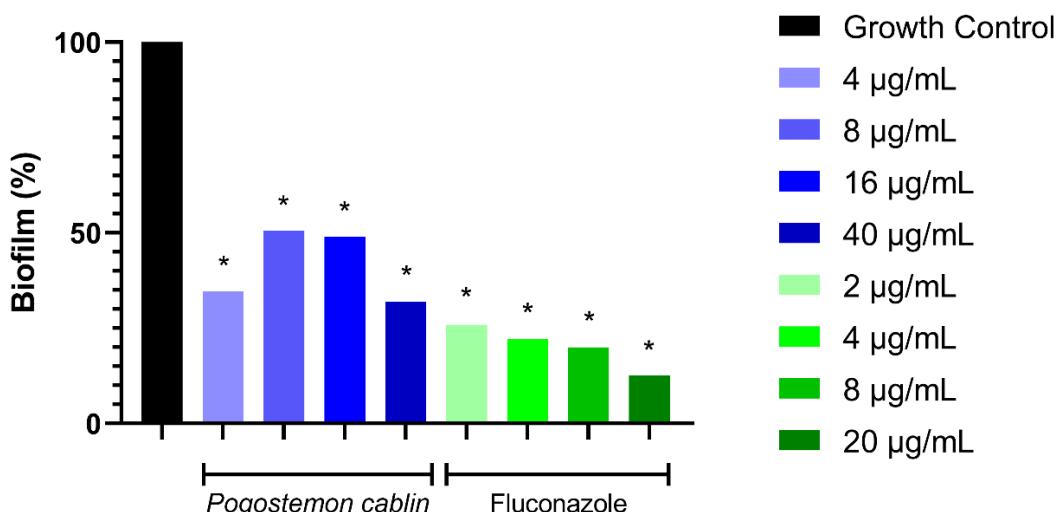


**Figura 1.** Efeito inibitório (média, desvio padrão) do óleo essencial de *Pogostemon cablin* e do Fluconazol na formação de biofilme de espécies únicas de *Candida*. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. (One-way ANOVA with Tukey post-test, \* $p<0.0001$ ).

O óleo essencial de *P. cablin* apresentou redução na formação de biofilme de 26% a 59% entre as concentrações 4 a 40  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Já o fluconazol apresentou redução de 88% a 90% entre as concentrações 2 a 20  $\mu\text{g/mL}$ . Houve diferença significativa quando comparado o controle de crescimento com todos os grupos testados ( $p<0.0001$ ).

## 6.7 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *P. cablin* SOBRE A REDUÇÃO DO BIOFILME FÚNGICO

Os resultados da atividade antimicrobiana sobre a redução do biofilme fúngico do óleo essencial de *Pogostemon cablin* e fluconazol estão expressos na Figura 2.



**Figura 2.** Efeito inibitório (média, desvio padrão) do óleo essencial de *Pogostemon cablin* e do Fluconazol no biofilme de espécies únicas de *Candida*. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  DP. (One-way ANOVA with Tukey post-test, \* $p<0.0001$ ).

O óleo essencial de *P. cablin* apresentou redução de 49% a 68% entre as concentrações 4 a 40  $\mu\text{g/mL}$ . Fluconazol apresentou redução de 74% a 87% entre as respectivas concentrações 2 a 20  $\mu\text{g/mL}$ . Houve diferença significativa quando comparado o controle de crescimento com todos os grupos testados ( $p<0.0001$ ).

## 7. DISCUSSÃO

Os produtos vegetais têm sido cada vez mais utilizados na indústria farmacêutica nos últimos anos. Ao combinar técnicas convencionais e metodologia moderna, o futuro dos fitomedicamentos tem se apresentado cientificamente eficaz (Fatima *et al.*, 2023). De acordo com Santos *et al.* (2022), o principal subproduto do *P. cablin* é o seu óleo essencial, amplamente conhecido como óleo de patchouli.

A CG-EM do óleo essencial de patchouli avaliado nesse estudo identificou o álcool de patchouli (15,11%), Δ-guaieno (9,85%) e α-guaieno (8,06%), compostos frequentemente encontrados em *P. cablin*, o mesmo também foi verificado por Verma *et al.*, (2019).

Alguns compostos, como (-)-*Caryophyllene oxide*, apresentaram áreas percentuais relativamente baixas (1,34%), mas são bioativos e contribuem para as propriedades terapêuticas do óleo essencial. Componentes como α-Guaiene e Δ-Guaiene são conhecidos por suas propriedades antimicrobianas e fragrâncias características, fundamentais para aplicações na indústria de cosméticos e farmacêutica (Jirovetz *et al.*, 2005; Aisyah *et al.* 2008; Swamy *et al.*, 2016).

O componente majoritário *Terephthalic acid, di(2-ethylhexyl) ester*, embora não seja comum em óleos essenciais, pode ser um contaminante ou um marcador de processos específicos de extração. Investigações adicionais seriam necessárias para esclarecer sua origem.

Galovicová *et al.* (2022) identificaram como os principais componentes voláteis do óleo essencial de *P.cablin*, o álcool de patchouli (31,0%), α-bulneseno (21,3%), α-guaieno (14,3%) e seicheleno (6,9%).

Kusuma *et al.* (2018), em seu estudo analisaram o óleo essencial das folhas secas de *P.cablin* e identificaram álcool de patchouli com 53,68%, α-guaieno 11,26% e azuleno 10,75% como os principais componentes. Os autores empregaram a extração por micro-ondas sem o uso de solvente, um método que pode alterar a composição do óleo essencial em relação à CG-MS, técnica utilizada para obter o óleo essencial analisado neste estudo.

De acordo com Feng *et al.* (2019), a análise do óleo essencial de *P. cablin* determinaram que o principal componente do óleo essencial foi o álcool de patchouli (51,1%), seguido pela fluoroacetofenona (23,5%) e β-patchoulene (7,3%).

A análise cromatográfica feita por Storck *et al.* (2015) identificou a presença de 13 diferentes constituintes no óleo essencial: álcool de patchouli, α-bulneseno, α-guaieno,

gama-patchouleno, gama-gurjuneno, germacreno-D, acifileno, 7-epi-alfa-selineno, beta-elemeno, beta-patchouleno, cariofileno, alfa-patchouleno e seicheleno. As variações na composição do *P. cablin* são atribuídas, principalmente, às diferenças climáticas e geográficas de cultivo, como colheita, secagem, processamento, método de extração, entre outros.

O óleo essencial é isolado principalmente da folha seca de patchouli por destilação a vapor. Álcool de patchouli e  $\alpha$ -patchoulene são os principais constituintes que regulam e controlam a qualidade do óleo essencial de patchouli. Os principais compostos deste óleo essencial são álcool de patchouli,  $\alpha$ -guaieno,  $\alpha$ -bulneseno,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -patchouleno,  $\gamma$ -curcumeno e alguns dos compostos menores são pogostona, limoneno, cedreno, viridiflorol,  $\gamma$ -himacaleno, dentre outros (Pandey *et al.*, 2021).

Conforme proposto por Sartoratto *et al.* (2004), a atividade antimicrobiana para óleos essenciais é classificada como forte quando estes apresentarem uma CIM de 50-500  $\mu\text{g/mL}$ , moderada para valores de CIM entre 600 a 1500  $\mu\text{g/mL}$  e fraca, ou produto inativo, para CIM acima de 1500  $\mu\text{g/mL}$ . Enquanto Webster e colaboradores, propuseram um valor de CIM satisfatório entre 1000 $\mu\text{g/mL}$  ou menos. Assim, os resultados deste estudo confirmam que o óleo essencial de *Pogostemon cablin* apresenta uma forte atividade antimicrobiana, exibindo elevada inibição contra as cepas de *Candida albicans*.

A metodologia apresentada por Alves *et al.* (2021) propõe um sistema de classificação para medir o potencial antifúngico de novos compostos com ação farmacológica contra espécies de *Candida*. A avaliação da bioatividade foi realizada com base nos valores de CIM e distribuída em cinco categorias: (a) bioatividade muito forte ( $\text{CIM} < 3,515 \mu\text{g/mL}$ ); (b) bioatividade forte ( $\text{CIM}$  entre 3,515 e 25  $\mu\text{g/mL}$ ); (c) bioatividade moderada ( $\text{CIM}$  entre 26 e 100  $\mu\text{g/mL}$ ); (d) bioatividade fraca ( $\text{CIM}$  entre 101 e 500  $\mu\text{g/mL}$ ); (e) bioatividade muito fraca ( $\text{CIM}$  entre 501 e 2000  $\mu\text{g/mL}$ ). Dessa forma, esse estudo demonstrou que o OE de *P. cablin* exibiu bioatividade considerada muito forte e forte frente a quase totalidade dos isolados clínicos testados com valores de CIM entre 2 e 4  $\mu\text{g/mL}$ ; apenas uma cepa clínica apresentou bioatividade considerada fraca, com CIM igual a 128  $\mu\text{g/mL}$ .

A cepa 97, sendo altamente filamentosa, demonstrou maior resistência ao óleo essencial, exigindo uma concentração de 128  $\mu\text{g/mL}$  para inibição. Essa resistência pode estar associada a diversos fatores, como a formação de biofilme, que dificulta a penetração

do óleo, e à expressão de genes relacionados à virulência e resistência antifúngica. Além disso, a morfologia filamentosa parece influenciar diretamente a susceptibilidade ao óleo essencial, tornando a cepa 97 menos sensível. Isso reforça a importância de considerar a morfologia e a capacidade de formação de biofilmes ao avaliar novos agentes antifúngicos.

O OE mostrou-se eficaz contra 91,6% das cepas de *C. albicans* em concentrações de até 4 µg/mL, tal valor indica sua elevada potência antifúngica. O efeito fungistático foi observado em 5 das 12 cepas testadas, indicando que o OE pode inibir o crescimento sem necessariamente eliminar o microrganismo em algumas cepas, sendo necessárias concentrações mais elevadas para matar as células fúngicas. Para as 7 demais, demonstrou efeito fungicida direto, assim este não apenas inibiu o crescimento, como também erradicou o microrganismo de maneira eficiente.

A capacidade do *P. cablin* de atuar de forma fungistática ou fungicida sugere que sua eficácia pode depender de fatores como a especificidade da cepa, a concentração utilizada e o tempo de exposição, o que pode ser vantajoso, visto que permite aplicações direcionadas, como tratamentos tópicos ou em combinação com outros antifúngicos para maximizar a eficácia, priorizando ser utilizado em situações onde o efeito fungicida é desejado.

Banu *et al.* (2018), ao estudar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Pogostemon heyneanus*, *Cinnamomum tamala* e *C. camphora* frente a cepas de *Candida albicans*, observou uma CIM de 0,6 µg/mL para os dois primeiros óleos e de 1 µg/mL para a *C. camphora*. Por outro lado, em um estudo *in vitro*, Zhang *et al.* (2024) avaliaram o álcool de patchouli, um componente majoritário do óleo essencial de *P. cablin*. Este inibiu 10 cepas de *C. albicans*, sendo 9 advindas de isolados clínicos e um padrão. Como resultado da CIM, todas as cepas obtiveram um valor de 64 µg/mL, o que corrobora com esse estudo em que todas as cepas ensaiadas apresentaram sensibilidade ao fitocomposto testado.

A atividade desse óleo também foi testada frente a outras cepas do gênero *Candida*. Em 2019, Cavalcante *et al.* obtiveram valores de CIM 50 igual a 128 µg/mL, sendo essa a menor concentração capaz de inibir o crescimento de metade das cepas de *C. tropicalis* ensaiadas. Adicionalmente, Alves *et al.* (2019) evidenciaram que o óleo de *Pogostemon cablin* exerce atividade antifúngica contra cepas de *Candida krusei*, apresentando valores de CIM igual a 32 µg/mL.

Da Cunha *et al.* (2023) analisaram a atividade antifúngica e a citotoxicidade do óleo essencial de Patchouli frente a cepas de *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Para ambas as espécies os resultados de CIM variaram entre 4 e 16 µg/mL, observou-se, contudo, que o óleo essencial de Patchouli demonstrou uma atividade mais potente contra cepas de *Candida albicans* em comparação com sua atividade frente às cepas de *C. parapsilosis*. Ademais, esse apresentou baixa taxa de hemólise em eritrócitos humanos do sistema ABO nas concentrações de 50 a 100 µg/mL e exibiu um efeito anti-hemolítico moderado nas concentrações de 500 a 1000 µg/mL nos tipos sanguíneos B e O.

Ao testarem o extrato da folha de *P. cablin* como um agente de limpeza de dentaduras, Liana *et al.* (2024) demonstraram que concentrações de 25% e 50% desse extrato apresentaram um menor número de colônias de *C. albicans* aderidas à superfície da resina acrílica quando comparadas a clorexidina 0,2%, um dos controles comerciais de enxaguatório bucal. Assim, mostrou-se como uma opção promissora para a limpeza de dentaduras devido às suas propriedades bioativas e à capacidade de reduzir o crescimento de fungo.

A ação antifúngica foi igualmente demonstrada por Aisyah, Yunita e Amanda (2021), utilizando a técnica de difusão em disco, observaram que a combinação do óleo de citronela com o óleo de Patchouli proporcionou uma inibição mais eficiente do fungo *Aspergillus niger* em comparação à nistatina, um antifúngico comercial de efeito conhecido. Além disso, demonstrou capacidade de inibir o crescimento de *C. albicans* em um diâmetro de zona de inibição de 6,80 mm.

A membrana plasmática e a parede celular dos fungos são alvos principais para a ação de medicamentos antifúngicos. Quando uma molécula inibe a síntese da parede celular, ocorre a lise das células fúngicas; no entanto, esse efeito é reduzido na presença de um agente protetor osmótico. Esse mecanismo é observado pelo aumento nos valores de CIM em meio contendo sorbitol, em comparação com o meio sem sorbitol. Outro mecanismo frequente envolve a interação direta com o ergosterol. Com a adição de ergosterol exógeno ao meio, a molécula se liga a ele, exigindo uma concentração mais alta para que a ação na célula fúngica seja efetiva. Consequentemente, o valor de CIM aumenta em meios com ergosterol em relação aos meios sem ergosterol (Escalante *et al.*, 2008; Sousa *et al.*, 2020).

Nos ensaios desse estudo, a adição de ergosterol exógeno aumentou os valores de CIM ( $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ ), sugerindo que o ergosterol adicional "sequestra" os compostos ativos do *P. cablin*, reduzindo sua disponibilidade para interagir com as membranas fúngicas. Isso sugere que o OE atua diretamente sobre o ergosterol para exercer seu efeito antifúngico.

Recentemente, estudos também investigaram o mecanismo de ação do óleo essencial de *P. cablin* (patchouli) como antifúngico. Zang *et al.* (2024) indicaram que seus efeitos se devem principalmente à presença de componentes como o álcool de patchouli (PA). Neste estudo, evidenciou-se que o PA inibiu o crescimento de múltiplas cepas de do gênero *Candida*, dentre elas, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsoriasis*, *C. krusei* e *C. tropicalis*, com CIMs de 64  $\mu\text{g/mL}$  e CFMs de 64 a 128  $\mu\text{g/mL}$ . Ademais, através de microscopia confocal foi possível observar que o fitoconstituinte inibiu a formação de biofilme e que o mecanismo anti-*Candida* pode estar associado a danos nas membranas celulares e à superprodução de ROS (espécies reativas de oxigênio).

Em contrapartida, em seu estudo, Da Cunha *et al.* (2023) constataram que o OE de *P. cablin* não teve alteração na CIM tanto na presença como na ausência do sorbitol e ergosterol. Entretanto nesse mesmo estudo obteve-se um efeito sinérgico ao associar o *P. cablin* à anfotericina B, antifúngico que possui seu mecanismo de ação consagrado na literatura. Essa interação é considerada promissora, principalmente para o tratamento de cepas resistentes, pois pode-se potencializar a eficácia terapêutica desse fármaco. Dessa maneira, faz-se necessário uma investigação mais abrangente, utilizando outras metodologias, a fim de identificar os alvos específicos de atuação desse óleo essencial.

O estudo sobre a formação de biofilmes é essencial para avaliar as propriedades antifúngicas de compostos naturais. Portanto, foi investigado se o óleo essencial de *P. cablin* poderia influenciar a capacidade de *C. albicans* de formar biofilmes. No presente estudo, o óleo essencial testado demonstrou um efeito dose-dependente na inibição da formação de biofilme, com a redução variando de 26% na concentração de 4  $\mu\text{g/mL}$ , valor correspondente à concentração inibitória mínima (CIM), a 59% na concentração de 40  $\mu\text{g/mL}$ .

Tais resultados sugerem que o OE possui compostos ativos capazes de interferir na aderência inicial ou no desenvolvimento estrutural do biofilme. Embora os percentuais de inibição sejam moderados, o efeito dose-dependente indica a possibilidade de otimização

das concentrações. Assim, o efeito observado reforça o potencial desse óleo como uma alternativa ou um coadjuvante no manejo de infecções associadas a biofilmes por *Candida*.

O fluconazol apresentou uma redução significativamente maior na formação de biofilmes, variando de 88% a 90% nas concentrações de 2 a 20 µg/mL. No entanto, mesmo com sua alta eficácia, o surgimento de cepas resistentes como um problema crescente em tratamentos antifúngicos deve ser levado em consideração. Nessa perspectiva, o OE de *P. cablin* pode ser avaliado como uma alternativa complementar para reduzir a formação de biofilmes e a resistência associada.

Em relação a redução do biofilme maduro, o óleo essencial exibiu uma redução significativa, concentrações de 4, 8, 16 e 40 µg/mL resultaram em reduções progressivas do biofilme, variando entre aproximadamente 49% e 68%. Esses resultados evidenciam o potencial antimicrobiano do OE de *P.cablin*, que possivelmente está relacionado à sua composição química, rica em compostos bioativos.

O fluconazol, um antifúngico amplamente utilizado, mostrou maior capacidade de inibição do biofilme (74% a 87%) mesmo em concentrações mais baixas (2 a 20 µg/mL), reafirmando sua eficácia como padrão-ouro no tratamento de infecções por *Candida*.

A análise estatística confirmou que tanto o óleo essencial quanto o fluconazol apresentaram reduções significativas em relação ao controle de crescimento. Essa significância reforça a relevância dos resultados e a eficácia dos tratamentos testados, o que ressalta a importância de explorar alternativas naturais, como óleos essenciais, principalmente considerando o atual cenário de resistência microbiana.

Galovicová *et al.* (2022) indicam que o óleo essencial de *P. cablin* possui atividade antifúngica contra *C. albicans* e exibe significativa atividade antibiofilme, sugerindo seu potencial uso na preservação de alimentos devido às suas propriedades antimicrobianas frente aos vários microrganismos testados e ao seu elevado poder antioxidante.

Yue *et al.* (2022) investigaram os mecanismos antifúngicos do extrato aquoso de Cao Huang Gui Xiang (CHGX), medicamento utilizado há 20 anos pela medicina tradicional chinesa. Este contém dentre seus constituintes 15g das partes aéreas do *P.cablin*. reconhecido por suas propriedades bioativas. No estudo, *C. albicans* não conseguiu formar biofilmes maduros em superfícies plásticas quando exposta a concentrações de 20, 10 e 5 mg/mL do extrato aquoso de CHGX, evidenciando sua eficácia na inibição da formação de biofilmes.

A intensidade do crescimento do biofilme variou conforme a concentração do extrato, sendo que o valor de CIM para o extrato aquoso de CHGX contra *C. albicans* foi de 20 mg/mL, significativamente superior à concentração inibitória mínima do biofilme (5 mg/mL). Esses resultados indicam que o efeito inibidor sobre a formação do biofilme é atribuído à atividade anti-biofilme do CHGX, e não à sua capacidade de inibir diretamente o crescimento da levedura (Yue *et al.* 2022).

A atividade antibiofilme do extrato aquoso de patchouli também foi testada frente ao *Vibrio harveyi* multirresistente, onde este pode inibir efetivamente a formação de biofilme, induzindo a regulação positiva dos genes bacterianos relacionados ao biofilme luxR e flaB e regulando negativamente a expressão de luxS, hfq e ompW com uma CIM de 31,25 mg/mL (Ji JiaLi *et al.*, 2018).

Ademais, Zang *et al.* (2024), observaram que o tratamento com o álcool de patchouli (AP) pode prejudicar a formação de biofilmes de *C. albicans*. A análise demonstrou que o aumento da concentração de AP leva a biofilmes mais esparsos e mais finos. E os biofilmes formados na presença de AP em maior concentração foram associados à perda de hifas.

Esses achados estão em concordância com o presente estudo, no qual o óleo essencial de *P. cablin* demonstrou capacidade de inibir a formação de biofilmes em concentrações até mil vezes menores do que as utilizadas nos estudos mencionados anteriormente.

A habilidade de alternar entre as formas de levedura e hifas filamentosas não apenas está diretamente relacionada à formação de biofilmes, mas também desempenha um papel crucial na virulência e no processo de patogênese de *C. albicans* (Sudbery, 2011; Noble *et al.*, 2017). Para explorar os efeitos do *P. cablin* na morfogênese, a transição de levedura para a forma filamentosa foi examinada.

Os resultados demonstram que o óleo essencial de *P. cablin* tem um impacto moderado, mas relevante, na filamentação de *C. albicans*, especialmente no que diz respeito à alteração das formas morfológicas predominantes.

Na análise inicial, após 1 hora de incubação, a presença do composto de *P. cablin* não gerou uma redução significativa na taxa de formação de tubos germinativos, indicando que o fitocomplexo não interfere de forma substancial nos estágios iniciais da transição morfológica induzida pelo soro bovino fetal e pela temperatura de 37°C. Essa ausência de

efeito inicial sugere que o composto pode não atuar diretamente na inibição da formação de tubos germinativos ou que sua ação depende de fatores cumulativos ao longo do tempo.

Após 3 horas, a análise baseada no Índice de Morfologia (IM) revelou alterações na morfologia das células. Na cepa ATCC, observou-se um predomínio de hifas verdadeiras na ausência do composto, com um IM médio de 2,61. Entretanto, na presença do *P. cablin*, o predomínio mudou para pseudo-hifas, resultando em uma redução do IM para 2,51. Essa mudança sugere que o fitocomplexo exerce uma ação moduladora que favorece uma morfologia menos filamentosa, o que pode estar relacionado à redução da virulência da *C. albicans*.

A cepa 97, conhecida por sua elevada capacidade de formação de hifas verdadeiras (IM de 3,42), apresentou apenas uma leve redução do IM para 3,38 na presença do óleo essencial. Essa diferença sutil sugere que, para cepas com alta propensão à filimentação, o impacto do *P. cablin* é menos expressivo, o que pode estar relacionado a diferenças genéticas ou à robustez intrínseca da cepa na transição morfológica.

Os dados sugerem que o *Pogostemon cablin* tem um efeito mais perceptível em cepas que apresentam menor capacidade filamentosa, promovendo uma alteração na predominância morfológica de hifas verdadeiras para pseudo-hifas. Essa modulação pode ser promissora no controle da virulência de *C. albicans*, já que a formação de hifas verdadeiras é essencial para a capacidade de invasão e a formação de biofilmes. No entanto, o impacto reduzido em cepas altamente filamentosas sugere que o composto pode ser mais eficaz como parte de uma estratégia combinada, associada a outros agentes antifúngicos ou moduladores.

A presença do OE resultou em uma redução significativa no comprimento das hifas, de 285,0 µm para 220,5 µm. Essa diminuição demonstra que o *P. cablin* interfere na extensão do crescimento filamentoso, mesmo em uma cepa altamente filamentosa como a 97. Tal fato pode impactar negativamente na virulência do patógeno e limitar seu impacto clínico em infecções associadas a biofilmes.

O mesmo foi observado no estudo de Yue *et al.* (2022). Após 3 horas de incubação em meio de glicose de Lee com 10% de soro fetal bovino, mais de 90% das células de *C. albicans* se transformaram em hifas. Com o extrato aquoso de CHGX, houve uma redução significativa na formação de hifas, que diminuiu ainda mais com o tempo de incubação. O mesmo efeito foi confirmado no meio RPMI 1640, onde, após 24 horas, as células tratadas

com CHGX apresentaram menos hifas em comparação às não tratadas. Esses resultados indicam que o CHGX inibe a formação de hifas e possui atividade anti-biofilme contra *C. albicans*.

No meio ágar-spider, o álcool de patchouli (AP) desempenhou um papel significativo na inibição da transição de levedura para hifa em *Candida albicans*, as colônias apresentaram bordas mais lisas e menos hifas na presença de AP, indicando que o composto afeta diretamente a capacidade de *C. albicans* de formar estruturas invasivas (Zang *et al.* 2024).

Ademais, em um modelo de camundongo humanizado de colite ulcerativa, estudos puderam identificar que o álcool de patchouli pode exercer efeitos benéficos adicionais ao inibir o crescimento de *C. albicans* e a formação de hifas (Qu *et al.*, 2017 , Wu *et al.*, 2020).

Barroso *et al.* (2023) avaliaram a atividade antifúngica de derivados de 2-ariloxazolininas sobre espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*. Os compostos testados inibiram a formação de hifas e a expressão de genes relacionados à morfogênese. Silva-Rocha *et al.* (2017), ao estudar a fração acetato de etila de *E. uniflora*, sugeriram que esta atua na parede celular de *C. albicans*, interagindo diretamente com proteínas importantes envolvidas na organização estrutural da morfologia e vias essenciais do metabolismo, o que refletiu em alterações estruturais que levaram à inibição da morfogênese. Esses achados sugerem que compostos direcionados à parede celular de *C. albicans* podem efetivamente inibir a morfogênese, dessa forma, como neste estudo o *P. cablin* teve sua ação direcionada à membrana celular fúngica, isso pode ter restringido seu efeito sobre a morfogênese, resultando em uma inibição parcial desse processo.

Esses resultados enfatizam a necessidade de estudos adicionais para compreender os mecanismos subjacentes à ação do *P. cablin*, incluindo sua influência na transição morfológica e sua potencial aplicação clínica no manejo de infecções causadas por *C. albicans*. Além disso, seria interessante investigar se o OE apresenta efeitos similares em outras espécies de *Candida* e determinar sua toxicidade e segurança em aplicações *in vivo*.

## 8. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *P. cablin* apresentou composição química complexa e relevante atividade sobre *C.albicans*, sendo essa atividade considerada fungicida para a maioria das cepas testadas. Sugere-se que essa ação antifúngica acontece pela complexação do óleo essencial ao ergosterol da membrana plasmática fúngica. Ademais, *P. cablin* atuou na formação e redução do biofilme e também exerceu influência sobre a morfogênese de *Candida albicans*. Esses resultados destacam seu potencial terapêutico como agente antifúngico natural. No entanto, são necessários mais estudos a fim de detalhar seu mecanismo de ação. Assim, mais investigações devem ser realizadas para avaliar sua aplicabilidade *in vivo*, buscando analisar sua citotoxicidade e investigar seus alvos terapêuticos. Essas pesquisas futuras contribuirão para validar o uso potencial como uma alternativa terapêutica, ajudando no tratamento das manifestações clínicas da candidíase.

## REFERÊNCIAS

Aisyah Y, Hastuti P, Sastrohamidjojo H, Hidayat C. Komposisi kimia dan sifat antibakteri minyak nilam (*Pogostemon cablin*) (Chemical composition and antibacterial properties of the essential oil of *Pogostemon cablin*). *Maj Farm Indones.* 2008;19(3):151-156.

Aisyah Y, Yunita D, Amanda A. Antimicrobial activity of patchouli (*Pogostemon cablin* Benth), citronella (*Cymbopogon nardus*), and nutmeg (*Myristica fragrans*) essential oil and their mixtures against pathogenic and food spoilage microbes. *IOP Conf Ser Earth Environ Sci.* 2021; 667(1): 012020. doi: 10.1088/1755-1315/667/1/012020.

Alves DDN, Martins RX, Ferreira EDS, Alves AF, de Andrade JC, Batista TM, Lazarini JG, Amorim LS, Rosalen PL, Farias DF, de Castro RD. Toxicological parameters of a formulation containing cinnamaldehyde for use in treatment of oral fungal infections: an in vivo study. *Biomed Res Int.* 2021; 2021:23056995. doi: 10.1155/2021/2305695.

Alves MS, de Medeiros MAA, Pereira CT, Simão K de LA, Simão B de LA, Diniz A de F, de Sousa AP, Medeiros CIS, Guênes GMT, Silva D de F, de Medeiros RS, dos Anjos RM, de Brito Júnior L, Lima E de O, de Oliveira Filho AA. Determinação da ação antifúngica do óleo de *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) em combate a cepas de *Candida krusei*. *Int J Dev Res.* 2019; 9:29640-29644.

Anand U, Jacobo-Herrera N, Altemimi A, Lakhssassi N. A comprehensive review on medicinal plants as antimicrobial therapeutics: potential avenues of biocompatible drug discovery. *Metabolites.* 2019; 9(11):258. doi: 10.3390/metabo9110258.

Banu SF, Rubini D, Shanmugavelan P, Murugan R, Gowrishankar S, Pandian SK, Nithyanand P. Effects of patchouli and cinnamon essential oils on biofilm and hyphae formation by *Candida* species. *J Mycol Med.* 2018; 28(2):332-339. doi: 10.1016/j.mycmed.2018.02.010.

Barroso VM, Reis JS, Stefani HA, Ishida K. 2-Aryloxazolines inhibit *Candida* clinical isolates growth and morphogenesis of *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. *The Microbe.* 2024; 3:100062. doi: 10.1016/j.microb.2024.100062.

Basmaciyan L, Bon F, Paradis T, Lapaquette P, Dalle F. *Candida albicans* interactions with the host: crossing the intestinal epithelial barrier. *Tissue Barriers*. 2019; 7(2):1612661. doi: 10.1080/21688370.2019.1612661.

Brandão HN, Meira IA, Dalle Piagge CSL, Cosme-Trindade DC. Fitoterapia no tratamento da candidíase oral: Um protocolo de revisão de escopo. *Res Soc Dev*. 2021;10(7):e35010716653. doi: 10.33448/rsd-v10i7.16653.

Cannon RD. Oral fungal infections: past, present, and future. *Front Oral Health*. 2022; 3:838639. doi: 10.3389/froh.2022.838639.

Cardeal ZL, da Silva MDRG, Marriott PJ. Comprehensive two-dimensional gas chromatography/mass spectrometric analysis of pepper volatiles. *Rapid Commun Mass Spectrom*. 2006; 20(19):2823-2836. doi: 10.1002/rcm.2690.

Cavalcante JNM, Ferreira JLS, Siqueira DS, Bezerra RV, Delgado LA, Silva RCMO, Filgueira RC, Silva DF, Lima EO, Oliveira Filho AA. Antifungal activity of the essential oil of *Pogostemon cablin* (Lamiaceae) against *Candida tropicalis* strains. *Int J Pharm Pharm Res*. 2019; 13:51-58.

Černáková L, Rodrigues CF. Microbial interactions and immunity response in oral *Candida* species. *Future Microbiol*. 2020; 15(17):1653-1677. doi: 10.2217/fmb-2020-0113.

Chaves GM, Bates S, MacCallum DM, Odds FC. *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genet Mol Res*. 2007; 6(4):1051-1063.

Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020; 11(1):337-348. doi: 10.1080/21505594.2020.1748930.

Chow EWL, Pang LM, Wang Y. From Jekyll to Hyde: the yeast–hyphal transition of *Candida albicans*. *Pathogens*. 2021; 10(7):859. doi: 10.3390/pathogens10070859.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. 4th ed. CLSI; 2017.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard; CLSI document M27-A3. CLSI; 2018.

Da Cunha SMD, Alves CA, Ribeiro LSM, Macedo MA, da Silva ALS, Cunha FN, de Lima BVSL, Silva DF, Lima EO, Oliveira Filho AA. Bioprospecting of the antifungal activity of Patchouli essential oil (*Pogostemon cablin* Benth) against strains of the genus *Candida*. *J Med Plants Res.* 2023; 17(1):1-7. doi: 10.5897/JMPR2022.7257.

Da Silva BD, Bernardes PC, Pinheiro PF, Fantuzzi E, Roberto CD. Chemical composition, extraction sources and action mechanisms of essential oils: Natural preservative and limitations of use in meat products. *Meat Sci.* 2021; 176:108463. doi: 10.1016/j.meatsci.2021.108463.

De Aguiar MMGB, Martinez RM, Baby AR, Serra CHDR. Considerations of Nystatin Roll in Oral Candidiasis Scenario and the COVID-19 Pandemic—A Review. *Future Pharmacol.* 2023; 3:834-845. doi: 10.3390/futurepharmacol3040050.

Dechayont B, Ruamdee P, Poonnaimuang S, Mokmued K, Chunthorng-Orn J. Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *J Bot.* 2017; 2017:8310275. doi: 10.1155/2017/8310275.

Di Cosola M, Cazzolla AP, Charitos IA, Ballini A, Inchingolo F, Santacroce L. *Candida albicans* and oral carcinogenesis. A brief review. *J Fungi (Basel).* 2021; 7(6):476. doi: 10.3390/jof7060476.

Do Prado VFF, Gomes JTP, da Costa Souza KV, Luz LES, de Lima RGM, Martins DS, da Paz ESL. Agentes antimicrobianos mais utilizados na Odontologia: uma revisão de literatura. *Res Soc Dev.* 2021; 10(14):e95101421668.

Donelian A, Carlson LHC, Lopes TJ, Machado RAF. Comparison of extraction of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil with supercritical CO<sub>2</sub> and by steam distillation. *J Supercrit Fluids*. 2009;48(1):15-20. doi: 10.1016/j.supflu.2008.09.020.

Du Q, Ren B, Ele J, Peng X, Guo Q, Zheng L, Li J, Dai H, Chen V, Zhang L, Xu X. *Candida albicans* promotes tooth decay by inducing oral microbial dysbiosis. *ISME J*. 2021;15(3):894-908. doi: 10.1038/s41396-020-00835-1.

Duarte AP, Luís A, Gallardo E. Natural Products: Therapeutic Properties and Beyond II. *Molecules*. 2022;27(19):6140. doi: 10.3390/molecules27196140.

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;71(10):1720-1725. doi: 10.1021/np070660i.

Fatima S, Farzeen I, Ashraf A, Aslam B, Ijaz MU, Hayat S, Zafar S, Nimrah Z, Jeremiah OU, Sogolo LL, Muzammil S. A comprehensive review on pharmacological activities of pachypodol: A bioactive compound of an aromatic medicinal plant *Pogostemon cablin* Benth. *Molecules*. 2023; 28(8):3469. doi: 10.3390/molecules28083469.

Feng YX, Wang Y, You CX, Guo SS, Du YS, Du SS. Bioactivities of Patchoulol and Phloroacetophenone from *Pogostemon cablin* Essential Oil against Three Insects. *Int J Food Prop*. 2019; 22(1):1365-1374. doi: 10.1080/10942912.2019.1650760.

Fontes MRV, Contessa CR, Moraes CC, Zavareze EDR, Dias ARG. Antimicrobial properties of PLA membranes loaded with pink pepper (*Schinus terebinthifolius* Raddi) essential oil applied in simulated cream cheese packaging. *Food Biophysics*. 2023; 18(1):107-119. doi: 10.1007/s11483-022-09750-x.

Freires IA, Murata RM, Furletti VF, Sartoratto A, Alencar SM, Figueira GM, et al. *Coriandrum sativum* L. (Coriander) Essential Oil: Antifungal Activity and Mode of Action on

*Candida* spp., and Molecular Targets Affected in Human Whole-Genome Expression. *PLoS One.* 2014; 9(6):e99086. doi: 10.1371/journal.pone.0099086.

Galovičová L, Borotová P, Valková V, Ďúranová H, Štefániková J, Vukovic NL, et al. Biological Activity of *Pogostemon cablin* Essential Oil and Its Potential Use for Food Preservation. *Agronomy.* 2022; 12(2):387. doi: 10.3390/agronomy12020387.

Gudaityte O, Venskutonis RP. Chemotypes of *Achillea millefolium* transferred from 14 different locations in Lithuania to the controlled environment. *Biochemical Systematics and Ecology.* 2007; 35(9):582-592. doi: 10.1016/j.bse.2007.03.016.

Hanaoka M, Domae E. IL-1 $\alpha$  released from oral epithelial cells upon candidalysin exposure initiates an early innate epithelial response. *Int Immunol.* 2021; 33(3):161-170. doi: 10.1093/intimm/dxaa070.

Hou GW, Huang T. Essential oils as promising treatments for treating *Candida albicans* infections: research progress, mechanisms, and clinical applications. *Front Pharmacol.* 2024; 15:1400105. doi: 10.3389/fphar.2024.1400105.

Hudaib M, Grazia Bellardi M, Rubies-Autonell C, Fiori J, Cavrini V. Chromatographic (GC-MS, HPLC) and virological evaluations of *Salvia sclarea* infected by BBWV-I. *Farmaco.* 2001; 56(3):219-227. doi: 10.1016/S0014-827X(01)01007-0.

Iba B, Falegbe RK, Iortyom C, Nwaohabuenyi TE, Asa YI, Ibeobi AC, Dogoh AF. Denture stomatitis. *Orapuh Lit Rev.* 2021; 1(1):OR006.

Ji Jiali JJ, Liu G, Feng Juan FJ, et al. Effect of *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. on biofilm formation and biofilm-related gene expression of multidrug resistant *Vibrio harveyi*. Universidade Farmacêutica de Guangdong. 2018; 34:239-243.  
Jirovetz L, Buchbauer G, Stoyanova AS, Georgiev EV, Damianova ST. Composition, quality control, and antimicrobial activity of the essential oil of *Pogostemon cablin*

(Patchouli oil) from various origins. *J Agric Food Chem.* 2005; 53(6):2145–2152. doi: 10.1021/jf050576g.

Junren C, Xiaofang X, Mengtin L, et al. Pharmacological activities and mechanisms of action of *Pogostemon cablin* Benth: a review. *Chin Med.* 2021; 16:1-20. doi: 10.1186/s13020-021-00313-0.

Kashyap B, Padala SR, Kaur G, Kullaa A. *Candida albicans* induces oral microbial dysbiosis and promotes oral diseases. *Microorganisms.* 2024; 12(11):2138. doi: 10.3390/microorganisms12112138.

Kusuma HS, Altway A, Mahfud M. Solvent-free microwave extraction of essential oil from dried patchouli (*Pogostemon cablin* Benth) leaves. *J Ind Eng Chem.* 2018; 58:343-348. doi: 10.1016/j.jiec.2017.10.029.

Lai CC, Chen SY, Ko WC, Hsueh, PR. Increased antimicrobial resistance during the COVID-19 pandemic. *Int J Antimicrob Agents.* 2021; 57(4):106324. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2021.106324.

Le Bars, P., Kouadio, A. A., Bandiaky, O. N., Le Guéhennec, L., & De La Rochette, M. F. (2022). Host's immunity and *Candida* species associated with denture stomatitis: A narrative review. *Microorganisms*, 10(11), 1437. doi: 10.3390/microorganisms10111437.

Lee HS, Lee J, Smolensky D, Lee SH. Potential benefits of patchouli alcohol in prevention of human diseases: a mechanistic review. *Int Immunopharmacol.* 2020; 89:107056. doi: 10.1016/j.intimp.2020.107056.

Lee Y, Puumala E, Robbins N, Cowen LE. Antifungal drug resistance: molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chem Rev.* 2021;121(6):3390-3411. doi: 10.1021/acs.chemrev.0c00199.

Liana R, Pocut AS, Cut FN, Poppy A, Ratu SR. Effectiveness of Patchouli Leaf Extract (*Pogostemon cablin*) with varying concentrations as an acrylic denture cleanser against the growth of *Candida albicans*: an experimental laboratory study. *J Int Oral Health*. 2024; 16(3):223-228.

Liu JM, Nan P, Tsering Q, Tsering T, Bai ZK, Wang L, Liu ZJ, Zhong Y. Volatile constituents of the leaves and flowers of *Salvia przewalskii* Maxim. from Tibet. *Flavour Fragr J*. 2006; 21(3):435-438. doi: 10.1002/ffj.1674.

Lobie TA, Roba AA, Booth JA, Kristiansen KI, Aseffa A, Skarstad K, Bjoras M. Antimicrobial resistance: A challenge awaiting the post-COVID-19 era. *Int J Infect Dis*. 2021; 111:322-325. doi: 10.1016/j.ijid.2021.08.033.

Lu SY. Oral candidosis: pathophysiology and best practice for diagnosis, classification, and successful management. *J Fungi*. 2021; 7(7):555. doi: 10.3390/jof7070555.

Moio L, Piombino P, Addeo F. Odour-impact compounds of Gorgonzola cheese. *J Dairy Res*. 2000; 67(2):273-285. doi: 10.1017/S0022029900004116.

Morad HOJ, Wild AM, Wiehr S, Davies G, Maurer A, Pichler BJ, Thornton CR. Pre-clinical imaging of invasive candidiasis using immunoPET/MR. *Front Microbiol*. 2018; 9:1996. doi: 10.3389/fmicb.2018.01996.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J Nat Prod*. 2020; 83(3):770-803. doi: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

Nivoix Y, Ledoux MP, Herbrecht R. Antifungal therapy: new and evolving therapies. Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine. *Semin Respir Crit Care Med*. 2020; 41(2):158-174. doi: 10.1055/s-0039-3400291.

Noble SM, Gianetti BA, Witchley JN. *Candida albicans* cell-type switching and functional plasticity in the mammalian host. *Nat Rev Microbiol.* 2017; 15(2):96-108. doi: 10.1038/nrmicro.2016.174.

Ok SM, Ho D, Lynd T, Ahn YW, Ju HM, Jeong SH, Cheon K. Candida infection associated with salivary gland—A narrative review. *J Clin Med.* 2021; 10(1):97. doi: 10.3390/jcm10010097.

Pandey SK, Gogoi R, Bhandari S, Sarma N, Begum T, Munda S, Lal M. A comparative study on chemical composition, pharmacological potential and toxicity of *Pogostemon cablin* Linn., (Patchouli) flower and leaf essential oil. *J Essent Oil Bear Plants.* 2022; 25(1):160-179. doi: 10.1080/0972060X.2022.2038637.

Pandey SK, Bhandari S, Sarma N, Begum T, Munda S, Baruah J, Gogoi R, Haldar S, Lal M. Composições de óleo essencial, importância farmacológica e práticas agrotecno lógicas de Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): Uma revisão. *J Essent Oil Bear Plants.* 2021; 24(6):1212-1226. doi: 10.1080/0972060X.2021.1900313.

Pavlova A, Sharafutdinov I. Recognition of *Candida albicans* and role of innate type 17 immunity in oral candidiasis. *Microorganisms.* 2020; 8(9):1340. doi: 10.3390/microorganisms8091340.

Pérez Zamora CM, Torres CA, Núñez MB. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. *Molecules.* 2018; 23(3):544. doi: 10.3390/molecules23030544.

Perić M, Miličić B, Kuzmanović Pfićer J, Živković R, Arsić Arsenijević V. A systematic review of denture stomatitis: predisposing factors, clinical features, etiology, and global *Candida* spp. distribution. *J Fungi.* 2024; 10(5):328. doi: 10.3390/jof10050328.

Plyuta V, Zaitseva J, Lobakova E, Zagorskina N, Kuznetsov A, Khmel I. Effect of plant phenolic compounds on biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa*. *APMIS.* 2013; 121(11):1073-1081. doi: 10.1111/apm.12139.

Pristov KE, Ghannoum MA. Resistance of *Candida* to azoles and echinocandins worldwide. *Clin Microbiol Infect.* 2019; 25(7):792-798. doi: 10.1016/j.cmi.2018.12.017.

Priya A, Pandian SK. Piperine impedes biofilm formation and hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Front Microbiol.* 2020; 11:756. doi: 10.3389/fmicb.2020.00756.

Qadri H, Qureshi MF, Mir MA, Shah AH. Glucose—the X factor for the survival of human fungal pathogens and disease progression in the host. *Microbiol Res.* 2021; 247:126725. doi: 10.1016/j.micres.2020.126725.

Qadri H, Shah AH, Ahmad SM, Alshehri B, Almilabary A, Mir MA. Natural products and their semi-synthetic derivatives against antimicrobial-resistant human pathogenic bacteria and fungi. *Saudi J Biol Sci.* 2022; 29(9):103376. doi: 10.1016/j.sjbs.2022.04.026.

Qu C, Yuan ZW, Yu XT, Huang YF, Yang GH, Chen JN, Zhang XJ. Patchouli alcohol ameliorates dextran sodium sulfate-induced experimental colitis and suppresses tryptophan catabolism. *Pharmacol Res.* 2017; 121:70-82. doi: 10.1016/j.phrs.2017.03.012.

Rabaan AA, Sulaiman T, Al-Ahmed SH, Buhaliqah ZA, Buhaliqah AA, Alyuosof B, Mohapatra RK. Potential strategies to control the risk of antifungal resistance in humans: A comprehensive review. *Antibiotics.* 2023; 12(3):608. doi: 10.3390/antibiotics12030608.

Ribeiro AB, de Araújo CB, Silva LEV, Fazan-Júnior R, Salgado HC, Ribeiro AB, da Silva-Lovato CH. Hygiene protocols for the treatment of denture-related stomatitis: local and systemic parameters analysis-a randomized, double-blind trial protocol. *Trials.* 2019; 20:1-10. doi: 10.1186/s13063-019-3489-1.

Rodríguez-Cerdeira C, Gregório MC, Molares-Vila A, López-Barcenas A, Fabbrocini G, Bardhi B, Sinani A, Sánchez-Blanco E, Arenas-Guzmán R, Hernandez-Castro R. Biofilms and vulvovaginal candidiasis. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2019; 174:110-125. doi: 10.1016/j.colsurfb.2018.11.016.

Santos GCO, Vasconcelos CC, Lopes AJO, Cartágenes MSS, Filho AKDB, Nascimento FRF, et al. Candida infections and therapeutic strategies: mechanisms of action for traditional and alternative agents. *Front Microbiol.* 2018; 9:1351. doi:10.3389/fmicb.2018.01351.

Santos LL, Brandão LB, da Costa ALP, Martins RL, Rodrigues ABL, Lobato AA, Almeida SSMS. Bioinsecticidal and pharmacological activities of the essential oil of *Pogostemon cablin* Benth leaves: A review. *Pharmacogn Rev.* 2022; 16(32):139-145. doi: 10.5530/phrev.2022.16.18.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composição e actividade antimicrobiana dos óleos essenciais de plantas aromáticas utilizadas no Brasil. *Rev Bras Microbiol.* 2004; 35(4):275-280. doi: 10.1590/S1517-83822004000400006.

Siddiqui ZN, Farooq F, Musthafa TM, Ahmad A, Khan AU. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *J Saudi Chem Soc.* 2013; 17(2):237-243. doi: 10.1016/j.jscs.2012.04.004.

Silva-Rocha WP, De Azevedo MF, Ferreira MRA, Da Silva JF, Svidzinski TIE, Milan EP, et al. Effect of the ethyl acetate fraction of *Eugenia uniflora* on proteins global expression during morphogenesis in *Candida albicans*. *Front Microbiol.* 2017; 8:1788. doi: 10.3389/fmicb.2017.01788.

Sivaramakrishnan G, Sridharan K. Alternatives to antifungal therapy for denture stomatitis: A systematic review and meta-analysis. *Saudi J Oral Sci.* 2017; 4(2):67-71. doi: 10.4103/sjos.sjos\_16\_17.

Sodiqova SA, Abdurazzoqov K, Abrorov Y, Isomova M. Manifestation of candidiasis in oral cavity. *Galaxy Int Interdisciplinary Res J.* 2023; 11(9):292-295. doi: 10.17605/OSF.IO/H35P9.

Sousa F, Ferreira D, Reis S, Costa P. Current insights on antifungal therapy: Novel nanotechnology approaches for drug delivery systems and new drugs from natural sources. *Pharmaceutics*. 2020; 13(9):248. doi: 10.3390/ph13090248.

Sousa J, Costa A, Leite M, Guerra F, Silva V, Menezes C. Antifungal activity of citral by disruption of ergosterol biosynthesis in fluconazole-resistant *Candida tropicalis*. *Int J Trop Dis Health*. 2016; 11(4):1-11. doi: 10.9734/IJTDH/2016/21423.

Spampinato C, Leonardi D. Candida infections, causes, targets, and resistance mechanisms: traditional and alternative antifungal agents. *Biomed Res Int*. 2013; 2013:204237. doi: 10.1155/2013/204237.

Spisni E, Petrocelli G, Imbesi V, Spigarelli R, Azzinnari D, Donati Sarti M. Antioxidant, anti-inflammatory, and microbial-modulating activities of essential oils: implications in colonic pathophysiology. *Int J Mol Sci*. 2020; 21(11):4152. doi: 10.3390/ijms21114152.

Storck RC, Deschamps C. Teor e composição do óleo essencial de patchouli (*Pogostemon cablin* (Blanco) Benth.) após diferentes tempos de secagem em estufa e temperatura ambiente. *Rev Bras Plantas Medic*. 2015; 17(4):570–576. doi: 10.1590/1983-084X/14\_020.

Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol*. 2011; 9(10):737–748. doi: 10.1038/nrmicro2619.

Sultan AS, Rizk AM, Vila T, Ji Y, Masri R, Jabra-Rizk MA. Digital design of a universal rat intraoral device for therapeutic evaluation of a topical formulation against *Candida*-associated denture stomatitis. *Infect Immun*. 2019; 87(12): e00617-19. doi: 10.1128/IAI.00617-19.

Svetaz L, Zuljan F, Derita M, Petenatti E, Tamayo G, Cáceres A, Gupta M. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties: A survey

among seven Latin American countries. *J Ethnopharmacol.* 2010; 127(1):137–158. doi: 10.1016/j.jep.2009.10.037.

Swamy MK, Sinniah URA. Comprehensive review on the phytochemical constituents and pharmacological activities of *Pogostemon cablin* Benth.: an aromatic medicinal plant of industrial importance. *Molecules.* 2015; 20(5):8521–8547. doi: 10.3390/molecules20058521.

Swamy MK, Sinniah UR. Patchouli (*Pogostemon cablin* Benth.): botany, agrotechnology and biotechnological aspects. *Ind Crops Prod.* 2016; 87:161–176. doi: 10.1016/j.indcrop.2016.04.026.

Tortorano AM, Prigitano A, Morroni G, Brescini L, Barchiesi F. Candidemia: evolution of drug resistance and novel therapeutic approaches. *Infect Drug Resist.* 2021; 14:5543–5553. doi: 10.2147/IDR.S274872.

Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *FEMS Pathog Dis.* 2016; 74(4):ftw018. doi: 10.1093/femspd/ftw018.

Valdivieso-Ugarte M, Gomez-Llorente C, Plaza-Díaz J, Gil Á. Antimicrobial, antioxidant, and immunomodulatory properties of essential oils: a systematic review. *Nutrients.* 2019; 11(11):2786. doi: 10.3390/nu11112786.

Verma RJ, Raval PJ. *Bull Environ Contam Toxicol.* 1991; 47(3):428–432. doi: 10.1007/BF01702206.

Verma RS, Padalia RC, Chauhan A, Singh VR. Chemical composition of leaves, inflorescence, whole aerial-parts and root essential oils of patchouli *Pogostemon cablin* (Blanco) Benth. *J Essent Oil Res.* 2019; 31(4):319–325. doi: 10.1080/0972060X.2019.1615279.

Vila T, Sultan AS, Montelongo-Jauregui D, Jabra-Rizk MA. Oral candidiasis: A disease of opportunity. *J Fungi*. 2020; 6(1):15. doi: 10.3390/jof6010015.

Virág E, Seffer D, Hűvös AP, Varajti K, Hegedűs G, Jankovics I, Pallos JP. Repurposed Nystatin to inhibit SARS-CoV-2 and mutants in the GI tract. *Biomed J Sci Tech Res*. 2021; 40(1):31854–31865. doi: 10.1101/2021.10.19.464931.

Wang Z, Xie Y, Sabier M, Zhang T, Deng J, Song X, Liao Z, Li Q, Yang S, Cao Y, Liu X, Zhou G. Trans-anethole is a potent toxic fumigant that partially inhibits rusty grain beetle (*Cryptolestes ferrugineus*) acetylcholinesterase activity. *Ind Crops Prod*. 2021; 161:113207. doi: 10.1016/j.indcrop.2021.113207.

Webster D, Taschereau P, Belland RJ, Sand C, Rennie RP. Antifungal activity of medicinal plant extracts: preliminary screening studies. *J Ethnopharmacol*. 2008; 115(1):140–146. doi: 10.1016/j.jep.2007.09.014.

Wu H, Li B, Wang X, Jin M, Wang G. Inhibitory effect and possible mechanism of action of patchouli alcohol against influenza A (H2N2) virus. *Molecules*. 2011; 16(8):6489–6501. doi: 10.3390/molecules16086489.

Wu Z, Zeng H, Zhang L, Pu Y, Li S, Yuan Y, Wang B. Patchouli alcohol: a natural sesquiterpene against both inflammation and intestinal barrier damage of ulcerative colitis. *Inflammation*. 2020; 43:1423–1435. doi: 10.1007/s10753-020-01255-z.

Wu ZN, Wu WG, Zhang T, Wang B. Research progress of chemical constituents and pharmacological effects of *Pogostemonis herba* from different habitats. *Mod Trad Chin Med Mater Med World Sci Technol*. 2019; 21(6):1227–1231.

Ye L, Zhang J, Xiao W, Liu S. Efficacy and mechanism of actions of natural antimicrobial drugs. *Pharmacol Ther*. 2020; 216:107671. doi: 10.1016/j.pharmthera.2020.107671.

Yu EJ, Kim TH, Kim KH, Lee HJ. Characterization of aroma-active compounds of *Abies nephrolepis* (Khingan fir) needles using aroma extract dilution analysis. *Flavour Fragr J.* 2004; 19(1):74–79. doi:10.1002/ffj.1314.

Yue H, Xu X, He S, Cui X, Guo Y, Zhao J, Peng B, Liu Q. Antifungal Mechanisms of a Chinese Herbal Medicine, Cao Huang Gui Xiang, Against *Candida* species. *Front Pharmacol.* 2022; 13:813818. doi: 10.3389/fphar.2022.813818.

Zacchino S. Strategies for the discovery of new antifungal agents. Medicinal plants from the perspective of modern medicinal chemistry. *Chapeco Ed. Argos.* 2001; 435–479.

Zarnowski R, Westler WM, Lacmbouh GA, Marita JM, Bothe JR, Bernhardt J, Lounes-Hadj Sahraoui A, Fontaine J, Sánchez H, Hatfield RD. Novel entries in a fungal biofilm matrix encyclopedia. *MBio.* 2014; 5(4):10.1128/mbio. 01333-14. doi: 10.1128/mbio.01333-14.

Zhang Q, Zhang J, Zhang Y, Sui Y, Du Y, Yang L, Yin Y. Antifungal and anti-biofilm activities of patchouli alcohol against *Candida albicans*. *Internacional Journal of Medical Microbiology.* 2024; 314: 151596. doi: 10.1016/j.ijmm.2023.151596.