



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

LEONARDO ANTUNES TRINDADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon nardus (L.) Rendle E DO FITOCONSTITUINTE CITRONELAL
SOBRE *Candida albicans***

Recife

2021

LEONARDO ANTUNES TRINDADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon nardus (L.) Rendle E DO FITOCONSTITUINTE CITRONELAL
SOBRE *Candida albicans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica integrada.

Orientador: Prof. Dra. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho.

Coorientador: Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima.

Recife

2021

Ficha catalográfica elaborada pela
Bibliotecária: Elaine Freitas, CRB4-1790

T833a	<p>Trindade, Leonardo Antunes</p> <p>Avaliação da atividade biológica do óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> (L.) Rendle e do fitoconstituente citronelal sobre <i>Candida albicans</i> / Leonardo Antunes Trindade. - 2021. 51 f.: il.</p> <p>Orientadora: Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho. Coorientador: Edeltrudes de Oliveira Lima. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde (CCS). Pós-graduação em Odontologia. Recife, 2021. Inclui referências e apêndice.</p> <p>1. Óleos essenciais. 2. <i>Cymbopogon nardus</i>. 3. Citronelal. 4. <i>Candida</i>. 5. Biofilmes. I. Carvalho, Alessandra de Albuquerque Tavares (Orientadora). II. Lima, Edeltrudes de Oliveira (coorientador) III. Título.</p> <p>617.6 CDD (22.ed.)</p>
-------	--

UFPE (CCS2021-114)

LEONARDO ANTUNES TRINDADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cymbopogon nardus (L.) Rendle E DO FITOCONSTITUINTE CITRONELAL
SOBRE *Candida albicans***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Odontologia.

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr^a. Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr. Danyel Elias da Cruz Perez (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Andrea dos Anjos Pontual (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Jurema Freire Lisboa de Castro (Examinadora Interna)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^o. Dr^a. Ana Claudia Amorim Gomes Dourado (Examinadora Externa)
Universidade de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Jane Sheila Higino (Examinadora Externa)
Universidade Federal de Pernambuco

A todos da minha família, em especial ao meu pai Franklin, minha mãe Maria Dolores, meu irmão Bruno, minha esposa Ingrid e ao meu filho amado Eduardo.

AGRADECIMENTOS

A Deus por minha família e amigos e por sempre me mostrar o caminho correto.

A minha orientadora Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho pelos ensinamentos, confiança, paciência, dedicação e profissionalismo.

A minha co-orientadora Edeltrudes de Oliveira Lima pelos ensinamentos, amizade, oportunidades, incentivos e muitas contribuições necessárias para realização deste trabalho.

Aos professores da pós-graduação da Universidade Federal de Pernambuco pela experiência e ensinamentos repassados.

A todos os amigos que contribuíram com a pesquisa, em especial, a Laísa Vilar, Daniele de Figuerêdo e Jefferson Muniz.

RESUMO

Candida albicans é um patógeno comensal e oportunista e sua interação com as células do hospedeiro é caracterizada por uma complexa expressão de fatores de virulência tais como plasticidade morfológica, patogenicidade, timotropismo, expressão de adesinas e invasinas na superfície celular, troca fenotípica, secreção de enzimas hidrolíticas e capacidade de formação de biofilmes as quais resultam em adesão, invasão e dano celular. Esse estudo investigou a atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon nardus* e citronelal em associação com miconazol e clorexidina sobre cepas clínicas de *C. albicans* bem como seu provável mecanismo de ação. Para tanto, o OE foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (GC-MS) e a Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração fungicida mínima (CFM) dos produtos foram determinadas por microdiluição. Utilizou-se o sorbitol e o ergosterol para investigação do mecanismo de ação dos produtos e para a associação, o ensaio de *ckeckerboard*. Também realizou-se o potencial de inibição e ruptura do biofilme pré-formado. O miconazol e a clorexidina foram utilizados como controles positivos e os ensaios realizados em triplicata. A análise por GC-MS identificou como composto majoritário o citronelal (42,28%) e a CIM e CFM dos produtos variaram entre 2 µg/mL à 512 µg/mL. O OE e citronelal apresentaram atividade sugestiva sobre a membrana celular fúngica e quando associados não apresentaram atividade sinérgica. Os produtos naturais utilizados apresentaram atividade significativa na inibição ($p < 0,05$) e ruptura dos biofilmes pré-formados ($p < 0,0001$). Dessa forma, o OE e citronelal demonstraram importante atividade antifúngica e antibiofilme sobre *C. albicans* e apontam esses produtos como promissores para ensaios clínicos.

Palavras-chave: Óleos essenciais. *Cymbopogon nardus*. Citronelal. *Candida*. Biofilmes.

ABSTRACT

Candida albicans is a commensal and opportunistic pathogen and its interaction with host cells is characterized by a complex expression of virulence factors such as morphological plasticity, pathogenicity, thymotropism, expression of adhesins and invasins on the cell surface, phenotypic exchange, enzyme secretion hydrolytic and biofilm formation capacity which result in cell adhesion, invasion and damage. This study investigated the antifungal and antibiofilm activity of *Cymbopogon nardus* and citronellal essential oil (EO) in combination with miconazole and chlorhexidine on clinical strains of *C. albicans* as well as its likely mechanism of action. For that, the EO was characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and the MIC and MFC of the products were determined by microdilution. Sorbitol and ergosterol were used to investigate the mechanism of action of the products and for the association, the checkerboard method. The potential for inhibition and rupture of the preformed biofilm was also realized. Miconazole and chlorhexidine were used as positive controls and the tests were performed in triplicate. The GC-MS analysis identified citronellal (42.28%) as the major compound and the MIC and MFC of the products ranged from 2 µg/mL to 512 µg/mL. EO and citronellal showed suggestive activity on the fungal cell membrane and when associated, they did not present synergistic activity. The natural products used showed significant activity in inhibition ($p < 0.05$) and rupture of preformed biofilms ($p < 0.0001$). Thus, the EO and citronellal demonstrated important antifungal and antibiofilm activity on *C. albicans* and point out these products as promising for clinical trials.

Keywords: Essential oil. *Cymbopogon nardus*. Citronellal. *Candida*. Biofilms.

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Inibição da formação do biofilme frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 76485 em diferentes concentrações.....	39
Gráfico 2 –	Inibição da formação do biofilme frente a <i>Candida albicans</i> LM 4 em diferentes concentrações.....	40
Gráfico 3 –	Porcentagem de formação do biofilme frente a <i>Candida albicans</i> ATCC 76485 em diferentes concentrações.....	41
Gráfico 4 –	Porcentagem de formação do biofilme frente a <i>Candida albicans</i> LM 4 em diferentes concentrações.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Caracterização do óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS).....	36
Tabela 2 –	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> , citronelal, miconazol e clorexidina sobre cepas de <i>Candida albicans</i>	37
Tabela 3 –	Efeito do óleo essencial de <i>C. nardus</i> e citronelal sobre as cepas de <i>C. albicans</i> (ATCC-76485 e LM-04) na ausência e presença de sorbitol 0, 8M e ergosterol 400µg/mL.....	38
Tabela 4 –	Associação do óleo essencial de <i>Cymbopogon nardus</i> e citronelal com miconazol e clorexidina para determinação do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) – método checkerboard.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorbância
CIM	Concentração inibitória mínima
CIF	Concentração inibitória fracionada
CFM	Concentração fungicida mínima
eV	Elétron-volt
ICIF	Índice da concentração inibitória fracionada
kPa	Quilopascal
M	Mol
m/z	Massa sobre carga
OE	Óleo essencial
UFC	Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	METODOLOGIA.....	16
2.1	Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS).....	16
2.2	Concentração inibitória mínima (CIM).....	17
2.3	Concentração fungicida mínima (CFM).....	17
2.4	Ensaio da ação/interação do OE de <i>C. nardus</i> e citronelal sobre a parede e a membrana celular fúngica.....	17
2.5	Ensaio de associação pelo método <i>checkerboard</i>	18
2.6	Inibição da formação do biofilme.....	19
2.7	Ruptura do biofilme pré-formado.....	19
2.8	Análise estatística.....	20
3	CONCLUSÃO.....	21
	REFERÊNCIAS.....	22
	APÊNDICE A - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Cymbopogon nardus</i> E DO CITRONELAL SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE <i>Candida albicans</i>	27

1 INTRODUÇÃO

Candida albicans é considerado o principal agente etiológico associado à patogênese da candidíase. Na cavidade oral, geralmente não causam danos aos indivíduos saudáveis, pois seu crescimento é restringido pelas barreiras imunológicas e outros microrganismos comensais no nicho. Entretanto, quando ocorre diminuição nessas barreiras, o crescimento excessivo de *C. albicans* pode levar a candidíase oral podendo apresentar um leve desconforto local e alterações gustativas, como também, a infecções sistêmicas graves com morbidade e mortalidade significativas^{1,2,3}.

As células epiteliais orais funcionam como uma barreira física e são a primeira linha de defesa contra *C. albicans*. Após o reconhecimento de *Candida*, essas células induzem a secreção de vários peptídeos antimicrobianos com efeito direto de morte na célula fúngica auxiliando no controle da colonização local^{4,5,6}. As células epiteliais secretam mediadores pró-inflamatórios como citocinas e quimiocinas (G-CSF, GM-CSF, IL-1, IL-6, IL-8 e CCL5) e sinalizam o recrutamento de células fagocíticas incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas ao local da infecção⁷⁻¹².

A secreção salivar e o seu fluxo constante desempenham um importante mecanismo de depuração mecânica evitando a aderência de *C. albicans* às células epiteliais sendo fundamental para a manutenção do estado comensal de *C. albicans*^{13,14}. Além disso, a saliva é altamente enriquecida em peptídeos antimicrobianos, que desempenham um papel vital na imunidade inata e defesa contra a colonização microbiana¹⁵⁻²⁰. Dentre os peptídeos antimicrobianos, as histatinas (família de 12 peptídeos catiônicos ricos em histidina) destacam-se por serem produzidas exclusivamente pelas glândulas salivares e por apresentarem atividade antimicrobiana de amplo espectro^{21,22}. A histatina-5 possui potente atividade antifúngica contra *C. albicans* e seu mecanismo está relacionado a ligação a receptores específicos na parede celular do fungo e a captação intracelular onde ela atinge a mitocôndria, interrompendo a homeostase celular²³⁻²⁶.

A candidíase oral acomete pacientes de todas as faixas etárias incluindo os de extrema idade²⁷ e estima-se que 5 a 7% dos bebês desenvolvem candidíase oral²⁸. Sua prevalência é de 30 a 45% em adultos saudáveis,²⁷ em pacientes com AIDS é estimada em 9 a 31% e aproximadamente 20% em pacientes em tratamento

de câncer²⁸. A candidíase sistêmica é menos frequente, mas carrega uma taxa de mortalidade alta 71 a 79%²⁹.

As espécies de *Candida* possuem fatores de virulência envolvidos com a formação de biofilmes, sendo a saliva, fluido gengival, pH e nutrientes fatores ambientais favoráveis aos processos de co-agregação e co-adesão entre *Candida* e outros microrganismos, incluindo as bactérias relacionadas a cárie dentária e doenças periodontais³⁰. A habilidade para formação de biofilmes está associada com a capacidade de causar infecções, representando um aumento na resistência aos fármacos antifúngicos e às defesas imunológicas do hospedeiro^{31,32}.

Na candidíase oral, a fase inicial e essencial da patogênese, implica no elevado potencial de aderência da *C. albicans* aos tecidos orais como também a uma superfície de acolhimento ou um dispositivo implantado, tal como as próteses e implantes dentários. Em geral, os biofilmes fúngicos possuem maior resistência às defesas do hospedeiro e a terapia antimicrobiana convencional, podendo resultar em infecções graves e persistentes³³⁻³⁵.

Os biofilmes são uma comunidade de microrganismos caracterizados por células irreversivelmente ligadas a uma superfície e incorporadas em uma matriz de substâncias poliméricas extracelulares. As células do biofilme (células sésseis) representam um fenótipo alterado e exibem expressão diferencial de genes em comparação com as células livres (planctônicas)³⁶. Os biofilmes fornecem vários benefícios ecológicos aos microrganismos como por exemplo, proteção contra o estresse ambiental, melhor aquisição de nutrientes, cooperação metabólica e persistência em nichos desfavoráveis³⁷.

Biofilmes de *Candida* quando envolvidos em um processo infeccioso resistem ao ataque do sistema imunológico do hospedeiro e dificultam o tratamento com a terapia antifúngica devido a sensibilidade reduzida a esses fármacos resultando em falhas clínicas³⁸⁻⁴⁰. Além disso, a formação desses biofilmes é um importante fator de virulência dessas espécies podendo atuar como reservatórios, liberando as células infecciosas e causando episódios repetidos de reinfecções⁴¹. Estudos de suscetibilidade demonstram que os biofilmes de *C. albicans* podem ser até 2.000 vezes mais resistentes aos fármacos antifúngicos do que as células planctônicas correspondentes⁴²⁻⁴⁴.

Os fármacos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas são representados pelos poliênicos (nistatina, anfotericina B), azólicos (miconazol,

cetoconazol, itraconazol), alilaminas (terbinafina), equinocandinas (caspofungina, micafungina) e análogos de nucleosídeos (flucitosina)⁴⁵⁻⁴⁷. O miconazol inibe a ação da síntese de ergosterol fúngico interagindo com a enzima 14-alfa desmetilase do citocromo P450 e inibindo o crescimento de leveduras patogênicas ao alterar a permeabilidade da membrana celular. O uso repetido de miconazol, no entanto, pode causar um risco de desenvolvimento de cepas resistentes ao azol⁴⁸ e os efeitos adversos relatados com mais frequência são a diarreia, dor de cabeça, náuseas e vômitos⁴⁹.

A clorexidina é um agente anti-séptico de amplo espectro antibacteriano, que atua contra bactérias gram-positivas e gram-negativas e alguns fungos⁵⁰. Suas formulações têm sido amplamente utilizadas para o controle químico do biofilme dental⁵¹ e para tratar infecções da cavidade oral. Entretanto, o seu uso prolongado pode desencadear efeitos adversos, tais como: gosto desagradável, alterações do paladar, pigmentação nos dentes e descamação oral^{52,53}.

As plantas medicinais têm um importante papel na saúde mundial e, estima-se que 25 a 30% de todos os fármacos avaliados como agentes terapêuticos são derivados de produtos naturais⁵⁴. Em virtude da ocorrência de fatores indesejáveis, somados à relativa toxicidade presente nos antifúngicos convencionais, o estudo de plantas com propriedades terapêuticas, abrangendo aquelas com atividade antimicrobiana, tem crescido bastante, não apenas por constituir-se em um recurso terapêutico alternativo, mas também devido às perspectivas de efeitos terapêuticos significativos frente aos fungos patogênicos^{55,56}.

Os óleos essenciais são compostos naturais e complexos obtidos a partir de plantas medicinais e caracterizados pelo forte odor e volatilidade. São formados pelos metabólitos secundários de plantas aromáticas e apresentam cerca de dois ou três componentes principais em concentrações relativamente elevadas (20-70%)⁵⁷. O gênero *Cymbopogon* é constituído de oitenta e cinco espécies. A espécie *Cymbopogon nardus* L. Rendle é uma planta originada do Ceilão e da Índia e pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae⁵⁸. O óleo essencial (OE) de *Cymbopogon nardus* é conhecido por apresentar características repelentes de insetos⁵⁹, antiespasmódicas, rubefacientes, estimulantes, carminativos, diaforéticos⁶⁰, antimicrobianas⁶¹ e antifúngicas⁶²⁻⁶⁵ sendo composto principalmente por monoterpenos (\pm 80%), o que inclui, principalmente, citronelal, citronelol e geraniol⁵⁹.

O citronelal é um monoterpeno formado predominantemente pelo metabolismo secundário das plantas apresenta-se como um líquido oleoso com odor de limão e pode ser encontrado em diversos óleos essenciais^{66,67}. A literatura tem demonstrado que o citronelal possui ação antifúngica^{65,68-72}, antibacteriana⁷³, anti-inflamatória⁷⁴ e antioxidante⁷⁵.

Dessa forma, a presente tese avaliou a atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* e do fitoconstituente citronelal sobre cepas de *C. albicans*.

2 METODOLOGIA

Esse estudo seguiu as normas da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde (CNS) e foi aprovado pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco (BRASIL) com CAAE: 87454417.7.00005208. Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (Brasil). A análise por GC/MS foi realizada no Laboratório de Ecologia Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco (Brasil). Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* ATCC 76485 e oriundas de cavidade oral e próteses dentárias LM 2B; LM 4; LM 9B; LM 9P; LM 12B; LM 12P; LM 13B; LM 19B; LM 19P; LM 62; LM 108; LM 122, mantidas em Agar Sabouraud dextrose (DIFCO®), estocadas a 4°C e a temperatura ambiente (28° a 30°C).

Nesse estudo foram utilizados o OE de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle e o citronelal obtidos comercialmente, respectivamente, na BIOESSÊNCIA® e SIGMA-ALDRICH®. O antifúngico miconazol e o antimicrobiano clorexidina foram obtidos, respectivamente, na SIGMA-ALDRICH® e RIOQUÍMICA® – Indústria Farmacêutica e utilizados como padrão. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (HIMEDIA®) com a preparação realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Para o inóculo, as cepas selecionadas foram mantidas no meio de cultura, durante 24-48 horas a 35-37°C e preparado e padronizado em solução fisiológica esterilizada, comparando-se com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland. Após agitação com o auxílio do aparelho Vortex (Fanem) durante 2 minutos, as suspensões foram ajustadas para 90% de transmitância no espectrofotômetro (Leitz-photometer 340-800), para conter cerca de 10^6 UFC/mL⁷⁶⁻⁷⁸.

2.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)

A caracterização do OE foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). Para tanto, foi utilizado o GC/MS 5975C Series (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), em sistema quadrupolo equipado com uma coluna DB-5 apolar (Agilent J&W; 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm espessura do filme). A temperatura do forno do GC foi conservada

a 60 °C pelo tempo de 3 min, e em seguida aumentada de 2,5 °C min⁻¹ até 240 °C e mantida dessa forma por 10 min. A pressão do fluxo de gás do hélio se manteve constante em 100 kPa, o injetor em temperatura 250 °C e no modo split (1:50). O detector foi operado em 280 °C, o potencial de ionização foi registrado em 70 eV com velocidade de escaneamento 0,5 varreduras⁻¹ na faixa de 20-350 m / z⁷⁹.

2.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da CIM do OE, citronelal, miconazol e clorexidina foram realizadas por meio da técnica da microdiluição. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI 1640 nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, foram distribuídos 100 µL da substância testada, a uma concentração inicial de 1024 µg/mL, que foi diluída seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Posteriormente, a amostra foi diluída em série, transferindo uma alíquota de 100 µL do primeiro poço para os seguintes. As concentrações variaram de 1024 a 2 µg/mL. Alíquotas de 10 µL do inóculo foram dispensadas nos poços de cada coluna. Paralelamente, controles de viabilidade e suscetibilidade ao miconazol e clorexidina também foram realizados pela mesma técnica. Os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas a 35-37°C por 24-48h. Dessa forma, a CIM foi considerada a menor concentração do produto em teste que impediu o crescimento visível do subcultivo⁷⁶⁻⁷⁸.

2.3 Concentração Fungicida Mínima (CFM)

Após determinar a CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas imediatamente mais concentradas (CIMx2 e CIMx4), bem como os controles positivos foram subcultivadas em placas de microdiluição de 96 poços com meio RPMI 1640 para determinar a concentração fungicida mínima (CFM). Após 24-48 horas de incubação a 35-37°C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM a menor concentração do produto que impediu o crescimento visível do subcultivo⁷⁸.

2.4 Ensaio da ação/interação do OE de *C. nardus* e citronelal sobre a parede e a membrana celular fúngica

Para verificar a ação dos produtos sobre a parede celular fúngica foram utilizadas as CIMs com a ausência e presença de sorbitol a 0,8 M. A determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol (0,8M), foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços. Em cada orifício da placa, foram adicionados 100 µL do RPMI 1640 previamente adicionado de sorbitol com peso molecular de 182,17g (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Em seguida, 100 µL dos produtos teste, também duplamente concentrados, foram adicionados nas cavidades da primeira linha da placa e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas as concentrações dos produtos e, no caso do sorbitol, uma concentração final de 0,8mol/L em cada cavidade. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo de *C. albicans* (ATCC 76485 e LM 4). Foram realizados controle de crescimento e de esterilidade. Após 24-48H de incubação a 35-37°C as leituras foram realizadas. Os ensaios foram efetuados em triplicata⁸⁰.

Para avaliar a interação dos produtos sobre a membrana celular fúngica foram utilizadas as CIMs com a ausência e presença do ergosterol (Sigma-Aldrich®) na concentração de 400 µg/mL. Foram utilizadas as mesmas cepas do item anterior e os ensaios foram realizados em triplicata com controle de crescimento e esterilidade. Para determinar a CIM dos produtos foi utilizada a técnica de microdiluição em placas de 96 poços semelhante ao protocolo exposto no ensaio anterior. Após 24-48H de incubação a 35-37°C as leituras foram realizadas⁸¹.

2.5 Ensaio de associação pelo método *checkerboard*

Foram utilizados o OE de *C. nardus* e citronelal associados aos antimicrobianos miconazol e clorexidina para determinação do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). Para realização desse ensaio, 100 µL de RPMI 1640 foram distribuídos nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades. Posteriormente, 50 µL dos produtos teste (OE e citronelal) nas concentrações (CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4) foram adicionados no sentido vertical e 50 µL dos antimicrobianos (miconazol e clorexidina), nas mesmas concentrações supracitadas, adicionados no sentido horizontal da microplaca. Por último, foram acrescentados 20 µL da suspensão fúngica (ATCC 76485 e LM 4), previamente ajustados de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland. As microplacas foram incubadas a 35-37°C e após 24-48H as leituras foram realizadas

para verificar o crescimento fúngico⁸². Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade e de viabilidade das cepas e os ensaios foram realizados em triplicata.

O ICIF foi calculado por meio da soma do $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o antimicrobiano e B o produto teste. O CIF^A , por sua vez, foi calculado pela relação CIM^A combinado/ CIM^A isolado, enquanto que o $CIF^B = CIM^B$ combinado/ CIM^B isolado. O índice foi interpretado de acordo com os seguintes critérios: sinergismo (≤ 0.5), aditividade/indiferença ($>0,5$ a ≤ 4) ou antagonismo ($>4,0$)⁸³.

2.6 Inibição da formação do biofilme

O ensaio foi baseado na metodologia de BALASUBRAMANIAN et al. (2012)⁸⁴, com modificações, e as análises realizadas em triplicata. Foram utilizadas placas de microdiluição para a incubação de 100 μ L de meio RPMI 1640 contendo diferentes concentrações ($CIM \times 4$, $CIM \times 2$, CIM , $CIM/2$, $CIM/4$) dos produtos testes (OE, citronelal, miconazol e clorexidina) e 10 μ L do inóculo de *C. abicans* (ATCC 76485 e LM 4). Para o controle negativo, apenas o meio de cultura e inóculo foram utilizados. Após o intervalo de 48h de incubação estática a 35-37°C, o conteúdo dos poços foi devidamente descartado e delicadamente lavados com água destilada estéril para remoção de qualquer crescimento planctônico (células não aderidas), e logo em seguida foram conservados para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, foram transferidos 140 μ L de solução de cristal violeta a 1% (NEWPROV[®]) repousando pelo tempo de 40 minutos. Em seguida o corante foi desprezado e utilizou-se água destilada para remoção dos excessos nas paredes dos poços e após estarem secos, receberam 140 μ L de etanol absoluto (RIOQUÍMICA[®]) para fixação. Após o período de 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan GO) à 590nm.

2.7 Ruptura do biofilme pré-formado

A capacidade de ruptura do biofilme pré-formado utilizando os produtos testes foi avaliada seguindo a metodologia descrita por RAJASEKHARAN et al. (2017)⁸⁵, com modificações, e as análises realizadas em triplicata. Foram incubados, em placas de microdiluição, 10 μ L de inóculo fúngico (ATCC 76485 e LM 4) e 100 μ L de meio RPMI 1640, estaticamente, durante 48h a 35-37°C para formação do biofilme. Em seguida, o conteúdo dos poços foi desprezado e foram novamente adicionados 100 μ L de meio RPMI 1640, desta vez com diferentes concentrações das

substâncias teste (CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4) sendo novamente incubados durante 48h a 35-37°C, de forma estática. Para o controle negativo foram utilizados apenas o meio de cultura e inóculo. Logo após, foi realizada a coloração do biofilme com cristal violeta a 1% e solubilização em etanol absoluto, seguida de leitura em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan GO) à 590nm utilizando-se a mesma metodologia descrita no item anterior. A porcentagem de ruptura do biofilme pré-formado foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % de ruptura do biofilme = $[(ABS_{590} \text{ controle} - ABS_{590} \text{ teste}) / ABS_{590} \text{ controle}] \times 100$.

2.8 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 8. Foi utilizada a análise two-way ANOVA com múltiplas comparações com pós teste de Tukey e intervalo de confiança de 95%.

3 CONCLUSÃO

Os resultados da presente tese demonstraram que o OE de *Cymbopogon nardus* apresentou o citronelal como seu composto majoritário, seguido do geraniol e citronelol. O OE e o fitoconstituente citronelal apresentaram atividade antifúngica inibindo 100% das cepas nas concentrações de 256 µg/mL. Os produtos avaliados sugerem atividade sobre a membrana celular fúngica e quando associados ao miconazol e/ou clorexidina não apresentaram atividade sinérgica. Ademais, apresentaram importante atividade antibiofilme, tanto na inibição quanto na ruptura do biofilme pré formado, apontando esses produtos como promissores para ensaios clínicos. Entretanto, ainda são necessários estudos complementares de biodisponibilidade e toxicidade para desenvolver aplicações clínicas para o uso dos produtos avaliados.

REFERÊNCIAS

- 1 Priya A, Pandian SK. Piperine impedes biofilm formation and hyphal morphogenesis of *Candida albicans*. *Front Microbiol.* 2020; 11:756.
- 2 Kaur S, Soni S, Singh R. Commensal and pathogen: *Candida albicans*. *AGEMS* 2017; 4:18–21.
- 3 Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff, A, Johnson E.M, Hanson MF, Williams C, Munro CA, Jones BJ, Ramage G. Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. *Clin. Microbiol. Infect.* 2016; 22:87–93.
- 4 Naglik JR, Moyes DL, Waächtler B, Hube B. *Candida albicans* interactions with epithelial cells and mucosal immunity. *Microbes Infect.* 2011; 13:963–976.
- 5 Li M, Chen Q, Tang R, Shen Y, Liu W. The expression of beta-defensin-2,3 and LL-37 induced by *Candida albicans* phospholipomannan in human keratinocytes. *J. Dermatol. Sci.* 2011; 61:72–75.
- 6 Naglik JR, König A, Hube B, Gaen SL. *Candida albicans*-epithelial interactions and induction of mucosal innate immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 2017; 40: 104–112.
- 7 Moyes DL, Naglik JR. Mucosal immunity and *Candida albicans* infection. *Clin. Dev. Immunol.* 2011; 2011:346307.
- 8 Netea MG, Maródi L. Innate immune mechanisms for recognition and uptake of *Candida* species. *Trends Immunol.* 2010; 31:346–353.
- 9 Schaller M, Mailhammer R, Grassl G, Sander CA, Hube B, Korting HC. Infection of human oral epithelia with *Candida* species induces cytokine expression correlated to the degree of virulence. *J. Investig. Dermatol.* 2002; 118:652–657.
- 10 Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, Stocking KL, Schurr J, Schwarzenberger P, Oliver P, Huang W, Zhang P, Zhang J. Requirement of interleukin 17 receptor signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 519–527.
- 11 Van der Meer JW, Van de Veerdonk FL, Joosten LA, Kullberg BJ, Netea MG. Severe *Candida* spp. infections: New insights into natural immunity. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2010; 36:S58–S62.
- 12 Hebecker B, Naglik JR, Hube B, Jacobsen ID. Pathogenicity mechanisms and host response during oral *Candida albicans* infections. *Expert. Rev. Anti-Infect. Ther.* 2014; 12:867–879.
- 13 Sultan AS, Kong EF, Rizk AM, Jabra-Rizk MA. The oral microbiome: A lesson in co-existence. *PLoS Pathog.* 2018; 14:e1006719.
- 14 Amerongen A, Veerman E. Saliva: The defender of the oral cavity. *Oral Dis.* 2002; 8:12–22.
- 15 Salvatori O, Puri S, Tati S, Edgerton M. Innate immunity and saliva in *Candida albicans*-mediated oral diseases. *J. Dent. Res.* 2016; 95:365–371.
- 16 Vila T, Rizk AM, Sultan AS, Jabra-Rizk, MA. The power of saliva: Antimicrobial and beyond. *PLoS Pathog.* 2019, in press.
- 17 Gorr S. Antimicrobial peptides of the oral cavity. *Periodontology* 2000. 2009; 51:152–180.

- 18 Auvynet C, Rosenstein Y. Multifunctional host defense peptides: Antimicrobial peptides, the small yet big players in innate and adaptive immunity. *FEBS J.* 2009; 276:6497–6508.
- 19 Peters BM, Shirtli ME, Jabra-Rizk MA. Antimicrobial peptides: Primeval molecules or future drugs? *PLoS Pathog.* 2010; 6:e1001067.
- 20 Khurshid Z, Naseem M, Yahya F, Mali M, Sannam KR, Sahibzada HA, Zafar MS, Faraz MS, Khan E. Significance and diagnostic role of antimicrobial cathelicidins (LL-37) peptides in oral health. *Biomolecules* 2017; 7:80.
- 21 Edgerton M, Koshlukova S, Lo T, Chrzan B, Straubinger R, Raj P. Candidacidal activity of salivary histatins. Identification of a histatin5-binding protein on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 1998; 273:20438–20447.
- 22 Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, Levitz SM, Diamond RD, Offner GD, Troxler RF. Histatins, a novel family of histidine-rich proteins in human parotid secretion. Isolation, characterization, primary structure, and fungistatic effects on *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 1988; 263:7472–7477.
- 23 Li XS, Reddy MS, Baev D, Edgerton M. *Candida albicans* Ssa1/2p is the cell envelope binding protein for human salivary histatin 5. *J. Biol. Chem.* 2003; 278:28553–28561.
- 24 Gyurko C, Lendenmann U, Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. Killing of *Candida albicans* by histatin 5: Cellular uptake and energy requirement. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2001; 79:297–309.
- 25 Mochon AB, Liu H. The antimicrobial peptide histatin-5 causes a spatially restricted disruption on the *Candida albicans* surface allowing rapid entry of the peptide into the cytoplasm. *PLoS Pathog.* 2008; 4:e1000190.
- 26 Helmerhorst EJ, Troxler RF, Oppenheim FG. The human salivary peptide histatin 5 exerts its antifungal activity through the formation of reactive oxygen species. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2001; 98:14637–14642.
- 27 Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. *Postgrad. Med. J.* 2002; 78:455–459.
- 28 Lalla RV, Patton LL, Dongari-Bagtzoglou A. Oral candidiasis: pathogenesis, clinical presentation, diagnosis and treatment strategies. *J. Calif. Dent. Assoc.* 2013; 41: 263–268.
- 29 Richardson MD. Changing patterns and trends in systemic fungal infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 2005; 56(Suppl.1);i5–i11.
- 30 Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 2006; 51(1):672-80.
- 31 Henriques M, Azeredo J, Oliveira R. Adhesion of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to acrylic and hydroxyapatite. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2004; 33(1):235-41.
- 32 Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL. *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot Cell.* 2005; 4(4):633-38.
- 33 Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. *Curr Opin Microbiol.* 2006; 9(6):588-94.
- 34 Ramage G, Martinez JP, Lopez-Ribot JL. *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 2006; 6:979-986.
- 35 Tsang CSP, NG H, Mc MILLAN AS. Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Invest.* 2007; 11:361–368.

- 36 Donlan RM, Costerton JW. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(2):167-93.
- 37 West SA, Diggle SP, Buckling A, Gardner A, Griffin AS. The social lives of microbes. *Ann Rev Ecol Evol Syst* 2007; 38:53-77.
- 38 Fanning S, Mitchell AP. Fungal biofilms. *PLoS Pathog.* 2012; 8(4):e1002585.
- 39 Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol* 2012; 2012.
- 40 Zhang X, Sun X, Wang Z, Zhang Y, Hou W. Keratitis-associated fungi form biofilms with reduced antifungal drug susceptibility biofilms formed by keratitis-associated fungi. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012; 53(12):7774-7778.
- 41 Srinivasan A, Lopez-Ribot JL, Ramasubramanian AK. Overcoming antifungal resistance. *Drug Discov Today: Technol* 2014; 11:65-71.
- 42 Kuhn DM, George T, Chandra J, Mukherjee PK, Ghannoum MA. Antifungal susceptibility of *Candida* biofilms: unique efficacy of amphotericin B lipid formulations and echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46(6):1773-80.
- 43 Seneviratne CJ, Jin LJ, Samaranayake YH, Samaranayake LP. Cell density and cell aging as factors modulating antifungal resistance of *Candida albicans* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(9):3259-66.
- 44 Mukherjee PK, Chandra J. *Candida* biofilm resistance. *Drug Res Updates* 2004; 7(4):301-9.
- 45 Mathew BP, Nath M. Recent approaches to antifungal therapy for invasive mycoses. *ChemMedChem.* 2009; 4(3):310-23.
- 46 Kathiravan MK, Salake AB, Chothe AS, Dudhe PB, Watode RP, Mukta MS, Gadhwe S. The biology and chemistry of antifungal agents: a review. *Bioorg Med Chem.* 2012; 20(19):5678-98.
- 47 Denning DW, Hope WW. Therapy for fungal diseases: opportunities and priorities. *Trends Microbiol.* 2010; 18(5):195-204.
- 48 Rautemaa R, Richardson M, Pfaller M, Perheentupa J, Saxen H. Reduction of fluconazole susceptibility of *Candida albicans* in APECED patients due to long-term use of ketoconazole and miconazole. *Scand J Infect Dis.* 2008; 40(11-12):904-7.
- 49 Zhang LW, Fu JY, Hua H, Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis.* 2016; 22(3):185-95.
- 50 Varoni E, Tarce M, Lodi G, Carrassi A. Chlorhexidine (CHX) in dentistry: state of the art. *Minerva Stomatol.* 2012; 61(9):399-419.
- 51 Adams D, Addy M. Mouthrinses. *Adv Dent Res.* 1994; 8(2):291-301.
- 52 Paraskevas S. Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. *Int J Dent Hyg.* 2005; 3(4):162-78.
- 53 Gunsolley JC. A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. *J Am Dent Assoc.* 2006; 137(12):1649-57.
- 54 Calixto J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *Journal of Ethnofarmacology.* 2005; 100:131-134.
- 55 Michelin DC, Moreschi PE, Lima AC, Nascimento GGF, Paganelli MO, Chaud MV. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. *Rev Bras Farmacogn.* 2005; 15(1):316-320.
- 56 Alves PM, Leite PHAS, Pereira JV, Pereira LF, Pereira MSV, Higino JS, Lima EO. Atividade antifúngica do extrato de *Psidium guajava* Linn. (goiabeira)

- sobre leveduras do gênero *Candida* da cavidade oral: uma avaliação *in vitro*. Rev Bras Farmacogn. 2006 16(2):192-196.
- 57 Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46:446-475.
- 58 Castro HG, Barbosa ICA, Leal TCAB, Souza CM, Nazareno, AC. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). Rev. Bras. Plant. Med. 2007; 9(4):55-61.
- 59 Beneti SC, Rosset E, Corazza ML, Frizzo CD, Luccio MD, Oliveira JV. Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. J Food Eng. 2011; 102:348–354.
- 60 Man HC, Hamzah MH, Jamaludin H, Abidin ZZ. Preliminary study: kinetics of oil extraction from citronella grass by ohmic heated hydro distillation. APCBEE Procedia. 2012; 3:124-128.
- 61 Billerbeck VG, Roques CG, Bessière J-M, Fonvieille J-L, Dargent R. Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. Can J Microbiol 2001; 47:9-17.
- 62 Li WR, Shi QS, Ouyang YS, Chen YB, Duan SS. Antifungal effects of citronella oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97(16):7483-92.
- 63 Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. Phytomedicine. 2011; 18:1181-1190.
- 64 Delespaul Q, Billerbeck VG, Roques CG, Michel G. The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. J Essent Oil Res. 2000; 12:256-266.
- 65 Trindade LA, Oliveira JA, Castro RD, Lima EO. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. Clin Oral Invest. 2015; 19:2223-2231.
- 66 Liu W, Xu X, Zhang R, Cheng T, Cao Y, Li X, Guo J, Liu H, Xian M. Engineering *Escherichia coli* for high-yield geraniol production with biotransformation of geranyl acetate to geraniol under fed-batch culture. Biotechnol Biofuels. 2016; 9:58.
- 67 Avoseh O, Oyedeji O, Rungqu P, Nkeh-Chungag B, Oyedeji A. *Cymbopogon* species; ethnopharmacology, phytochemistry and the pharmacological importance. Molecules. 2015; 20(5):7438-53.
- 68 Wu Y, OuYang Q, Tao N. Plasma membrane damage contributes to antifungal activity of citronellal against *Penicillium digitatum*. J Food Sci Technol. 2016; (10):3853-3858.
- 69 Nakahara K, Alzoreky NS, Yoshihashi T, Nguyen HTT, Trakoontivakorn G. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella Grass). Jpn. Agric. Res. Q. 2003; 37:249–252.
- 70 Aguiar RW, Ootani MA, Ascencio SD, Ferreira TP, Dos Santos MM, dos Santos GR. Fumigant antifungal activity of *Corymbia citriodora* and *Cymbopogon nardus* essential oils and citronellal against three fungal species. ScientificWorldJournal. 2014; 2014:492138.
- 71 Singh S, Zeeshan F, Hameed S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 2016; 49:465-472.

- 72 Oliveira HMBF, Filho AAO, Lima EO, Júnior JPS. Antifungal effect of synthetic isomer (R)-(+)-citronellal against *Candida* strains. *Lat. Am. J. Pharm.* 2017; 36:408-411.
- 73 Lopez-Romero JC, González-Ríos H, Borges A, Simões M. Antibacterial effects and mode of action of selected essential oils components against *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2015; 2015:795435.
- 74 de Santana MT, de Oliveira MG, Santana MF, De Sousa DP, Santana DG, Camargo EA, de Oliveira AP, Almeida JR, Quintans-Júnior LJ Jr. Citronellal, a monoterpene present in Java citronella oil, attenuates mechanical nociception response in mice. *Pharm Biol.* 2013; 9:1144-9.
- 75 Melo MS, Santana MT, Guimarães AG, Siqueira RS, Sousa DP, Santos RV, Bonjardim IR, Araújo AAS, Onofre ASC, Lima JT, Almeida JRGS, Quintans-Júnior IJ. Bioassay-guided evaluation of central nervous system effects of citronellal in rodents. *Rev. Bras. Farmacogn.* 2011; 21:697-703.
- 76 Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections In: LORIAN, V. **Antibiotics in laboratory medicine**. 3. ed. Baltimore: Williams and Wilkiam, 1991;739-787.
- 77 Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal.* 2000; 11:137-147.
- 78 Balouri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal.* 2016; 6(2):71-79.
- 79 Adams RP. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography Quadupole 988 Mass Spectroscopy**. 2009. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, 804p
- 80 Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antibiot (Tokyo)*. 1995; 48(4):306-310.
- 81 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.
- 82 White RL, Burgess DS, Mandruru M, Bosso JA. Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(8):1914-1918.
- 83 Mackay ML, Milne K, Goul IM. Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int J Antimicrob Agents.* 2000; 15: 125-129.
- 84 Balasubramanian D, Schneper L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K. The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa* AmpC β -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. *PLoS One.* 2012; 7(3):e34067.
- 85 Rajasekharan SK, Ramesh S, Satish AS, Lee J. Antibiofilm and Anti- β -Lactamase Activities of Burdock Root Extract and Chlorogenic Acid against *Klebsiella pneumoniae*. *J Microbiol Biotechnol.* 2017; 27(3):542-551.

APÊNDICE A - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ANTIBIOFILME DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon nardus* E DO CITRONELAL SOBRE CEPAS CLÍNICAS DE *Candida albicans*.

O manuscrito será enviado ao periódico *Clinical Oral Investigations* (Qualis A1 na área de odontologia)

Leonardo Antunes Trindade¹, Laísa Vilar Cordeiro², Daniele de Figuerêdo Silva², Pedro Thiago Ramalho Figueiredo², Edeltrudes de Oliveira Lima², Alessandra de Albuquerque Tavares Carvalho^{1*}

¹ Programa de pós graduação em odontologia – Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)

² Programa de produtos naturais e sintéticos bioativos – Universidade Federal da Paraíba

* To whom correspondence should be addressed. Leonardo Antunes Trindade, Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Clínica e Odontologia Preventiva. Quarta Travessa Artur de Sá, s/n Cidade Universitária 50670-901 - Recife, PE – Brasil Telephone: +55 81 21268342.

E-mail: lat363@gmail.com

RESUMO

Objetivo Esse estudo investigou a atividade antifúngica e antibiofilme do óleo essencial (OE) de *Cymbopogon nardus* e citronelal em associação com miconazol e clorexidina sobre cepas clínicas de *Candida albicans* bem como seu provável mecanismo de ação. **Materiais e Métodos** O OE foi caracterizado por cromatografia gasosa acoplado a espectrometria de massa (GC-MS) e a CIM e CFM dos produtos foram determinadas por microdiluição. Utilizou-se o sorbitol e o ergosterol para investigação do mecanismo de ação dos produtos e para a associação, o ensaio de *checkerboard*. Também realizou-se o potencial de inibição e ruptura do biofilme pré-formado pela técnica de microdiluição. O miconazol e a clorexidina foram utilizados como controles positivos e os ensaios realizados em triplicata. **Resultados** A análise por GC-MS identificou o citronelal como composto majoritário e as CIMs do OE, citronelal, miconazol e clorexidina capazes de inibir 100% das cepas foram de 256 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL e 8 µg/mL, respectivamente. O OE e citronelal apresentaram atividade sugestiva sobre a membrana celular fúngica e quando associados não apresentaram atividade sinérgica. Os produtos naturais apresentaram atividade significativa na inibição ($p < 0,05$) e ruptura dos biofilmes pré-formados ($p < 0,0001$). **Conclusão** O OE e citronelal demonstraram importante atividade antifúngica e antibiofilme sobre *C. albicans*. **Relevância Clínica** Existe uma constante busca por produtos de origem natural que sejam eficazes no controle dos biofilmes fúngicos. Os resultados apontam esses produtos como promissores para ensaios clínicos, entretanto, estudos complementares de biodisponibilidade e toxicidade devem ser realizados a fim de torna-los uma alternativa para a remoção química do biofilme oral.

Key words: *Cymbopogon*, citronellal, *Candida*, antifungal, antibiofilm.

Introdução

Candida albicans é um patógeno comensal e oportunista que causa infecções normalmente em consequência de uma alteração na resposta imunológica do hospedeiro [1]. Esses microrganismos apresentam versatilidade no seu estado patogênico e uma de suas principais características de virulência é a capacidade de formação de biofilmes. O aumento da resistência aos medicamentos, sua diversificação morfológica, natureza recalcitrante e trocas fenotípicas mais significativas estão presentes no estado sésil de *C. albicans* causando repercussões clínicas importantes [2].

A interação entre *C. albicans* e as células do hospedeiro é caracterizada por uma complexa expressão de fatores de virulência as quais resultam em adesão, invasão e dano celular [3]. Dentre as propriedades de virulência destacam-se a plasticidade morfológica, patogenicidade, timotropismo (detecção de contato), a expressão de adesinas e invasinas na superfície da célula, troca fenotípica, secreção de enzimas hidrolíticas e capacidade de formação de biofilmes [4].

Os biofilmes fúngicos são compostos por comunidades de formas heterogêneas como hifas, pseudo-hifas e blastoconídios, que se incorporam a uma matriz extracelular contendo polissacarídeos, proteínas e ácidos nucléicos [5]. Além disso, fatores ambientais como a saliva, fluido gengival, pH e nutrientes são favoráveis aos processos de co-agregação e co-adesão entre *Candida* e outros microrganismos, em especial as bactérias, estando associadas as principais patologias da cavidade oral, bem como a cárie dentária e a doença periodontal [6].

Os microrganismos comensais da cavidade oral e as barreiras imunológicas restringem o crescimento de *C. albicans* impedindo que cause danos aos indivíduos saudáveis [7]. No entanto, quando os hospedeiros apresentam diminuição dessas barreiras, o crescimento excessivo de *C. albicans* podem levar a sintomas como um leve desconforto local e alterações da sensação do paladar à infecções sistêmicas graves com morbidade e mortalidade significativas [8].

Em geral, os biofilmes fúngicos possuem maior resistência às defesas do hospedeiro como também a terapia antimicrobiana convencional resultando em infecções graves e persistentes, efeitos colaterais indesejáveis e rápido desenvolvimento de resistência aos medicamentos [9-12]. A resistência da *C. albicans* tem sido demonstrada em vários estudos podendo chegar a aproximadamente 40% com a utilização de miconazol, 45% entre os indivíduos que

receberam terapêutica prévia ao fluconazol e, dos isolados resistentes, 93% apresentam resistência cruzada ao itraconazol [13,14].

A terapia antibiótica de amplo espectro e o uso de próteses dentárias mal higienizadas, associadas à hipossalivação, pode ser observada como fatores que predispõem ao aparecimento da candidíase oral [15,16]. Dentre os fármacos disponíveis para tratamento de infecções fúngicas destacam-se os poliênicos (anfotericina B e nistatina) e azólicos (fluconazol, itraconazol, miconazol, cetoconazol), sendo estes últimos os de primeira escolha para tratamento dessas doenças e são geralmente fungistáticos [17]. A clorexidina por sua vez apresenta amplo espectro antimicrobiano tanto sobre bactérias quanto sobre fungos inibindo à formação de biofilmes [18]

Os produtos naturais tem demonstrado ser uma alternativa às substâncias químicas sintéticas. O gênero *Cymbopogon* é constituído de oitenta e cinco espécies. A espécie *Cymbopogon nardus* L. Rendle é uma planta originada do Ceilão e da Índia e pertence à família Poaceae, subfamília Panicoideae [19]. O óleo essencial (OE) de *C. nardus*, conhecido popularmente como OE de citronela, tem demonstrado na literatura características como repelentes de insetos [20], antiespasmódicas, rubefacientes, estimulantes, carminativos, diaforéticos [21] e antimicrobianas [22-26] sendo composto principalmente por monoterpenos (\pm 80%), o que inclui, principalmente, citronelal, citronelol, e geraniol [20].

Esse estudo teve como objetivo avaliar a atividade antifúngica e antibiofilme do OE de *C. nardus* e fitoconstituente citronelal sobre cepas clínicas de *Candida albicans*.

Materiais e métodos

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal da Paraíba (Brasil). Foram utilizadas cepas de *Candida albicans* padrão ATCC 76485 e oriundas de cavidade oral e próteses dentárias LM 2B; LM 4; LM 9B; LM 9P; LM 12B; LM 12P; LM 13B; LM 19B; LM 19P; LM 62; LM 108; LM 122, mantidas em Agar Sabouraud dextrose (DIFCO®), estocadas a 4°C e a temperatura ambiente (28° a 30°C).

Nesse estudo foram utilizados o OE de *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle e o fitoconstituente citronelal obtidos comercialmente, respectivamente, na BIOESSÊNCIA® e SIGMA-ALDRICH®. O antifúngico miconazol e o antimicrobiano clorexidina foram obtidos, respectivamente, na SIGMA-ALDRICH® e RIOQUÍMICA® – Indústria Farmacêutica e utilizados como padrão. O meio de cultura utilizado foi o RPMI 1640 (HIMEDIA®) com a preparação realizada de acordo com as instruções do fabricante.

Para o inóculo, as cepas selecionadas foram mantidas no meio de cultura, durante 24-48 horas a 35-37°C e preparado e padronizado em solução fisiológica esterilizada, comparando-se com uma suspensão de sulfato de bário do tubo nº 0,5 da escala Mc Farland. Após agitação com o auxílio do aparelho Vortex (Fanem) durante 2 minutos, as suspensões foram ajustadas para 90% de transmitância no espectrofotômetro (Leitz-photometer 340-800), para conter cerca de 10⁶ UFC/mL [27-29].

Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS)

A caracterização do OE foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS). Para tanto, foi utilizado o GC/MS 5975C Series (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), em sistema quadrupolo equipado com uma coluna DB-5 apolar (Agilent J&W; 60 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno, 0,25 µm espessura do filme). A temperatura do forno do GC foi conservada a 60 °C pelo tempo de 3 min, e em seguida aumentada de 2,5 °C min⁻¹ até 240 °C e mantida dessa forma por 10 min. A pressão do fluxo de gás do hélio se manteve constante em 100 kPa, o injetor em temperatura 250 °C e no modo split (1:50). O

detector foi operado em 280 °C, o potencial de ionização foi registrado em 70 eV com velocidade de escaneamento 0,5 varreduras⁻¹ na faixa de 20-350 m / z.

Concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM do OE, citronelal, miconazol e clorexidina foram realizadas por meio da técnica da microdiluição. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de RPMI 1640 nos orifícios das placas de microdiluição. Em seguida, foram distribuídos 100 µL da substância testada, a uma concentração inicial de 1024 µg/mL, que foi diluída seriadamente, a partir da retirada de uma alíquota de 100 µL da cavidade mais concentrada para a cavidade sucessora. Posteriormente, a amostra foi diluída em série, transferindo uma alíquota de 100 µL do primeiro poço para os seguintes. As concentrações variaram de 1024 a 2 µg/mL. Alíquotas de 10 µL do inóculo foram dispensadas nos poços de cada coluna. Paralelamente, controles de viabilidade e suscetibilidade ao miconazol e clorexidina também foram realizados pela mesma técnica. Os testes foram realizados em triplicata e as placas foram incubadas a 35-37°C por 24-48h. Dessa forma, a CIM foi considerada a menor concentração do produto em teste que impediu o crescimento visível do subcultivo [27-29].

Concentração fungicida mínima (CFM)

Após determinar a CIM, a concentração correspondente à inibitória e as duas imediatamente mais concentradas (CIMx2 e CIMx4), bem como os controles positivos foram subcultivadas em placas de microdiluição de 96 poços com meio RPMI 1640 para determinar a concentração fungicida mínima (CFM). Após 24-48 horas de incubação a 35-37°C, as leituras das CFMs foram realizadas com base no crescimento dos controles, sendo considerada CFM a menor concentração do produto que impediu o crescimento visível do subcultivo [29].

Ensaio da ação/interação do OE de *C. nardus* e citronelal sobre a parede e a membrana celular fúngica

Para verificar a ação dos produtos sobre a parede celular fúngica foram utilizadas as CIMs com a ausência e presença de sorbitol a 0,8 M. A determinação da CIM dos produtos, na presença do sorbitol (0,8M), foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços. Em cada orifício da placa, foram adicionados

100 µL do RPMI 1640 previamente adicionado de sorbitol com peso molecular de 182,17g (VETEC Química Fina Ltda – Rio de Janeiro/RJ), ambos duplamente concentrados. Em seguida, 100 µL dos produtos teste, também duplamente concentrados, foram adicionados nas cavidades da primeira linha da placa e por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas as concentrações dos produtos e, no caso do sorbitol, uma concentração final de 0,8mol/L em cada cavidade. Por fim, foram adicionados 10 µL do inóculo de *C. albicans* (ATCC 76485 e LM 4). Foram realizados controle de crescimento e de esterilidade. Após 24-48H de incubação a 35-37°C as leituras foram realizadas. Os ensaios foram efetuados em triplicata [30].

Para avaliar a interação dos produtos sobre a membrana celular fúngica foram utilizadas as CIMs com a ausência e presença do ergosterol (Sigma-Aldrich®) na concentração de 400 µg/mL. Foram utilizadas as mesmas cepas do item anterior e os ensaios foram realizados em triplicata com controle de crescimento e esterilidade. Para determinar a CIM dos produtos foi utilizada a técnica de microdiluição em placas de 96 poços semelhante ao protocolo exposto no ensaio anterior. Após 24-48H de incubação a 35-37°C as leituras foram realizadas [31].

Ensaio de associação pelo método *checkerboard*

Foram utilizados o OE de *C. nardus* e citronelal associados aos antimicrobianos miconazol e clorexidina para determinação do índice da concentração inibitória fracionada (ICIF). Para realização desse ensaio, 100 µL de RPMI 1640 foram distribuídos nos poços da microplaca estéril contendo 96 cavidades. Posteriormente, 50 µL dos produtos teste (OE e citronelal) nas concentrações (CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4) foram adicionados no sentido vertical e 50 µL dos antimicrobianos (miconazol e clorexidina), nas mesmas concentrações supracitadas, adicionados no sentido horizontal da microplaca. Por último, foram acrescentados 20 µL da suspensão fúngica (ATCC 76485 e LM 4), previamente ajustados de acordo com o tubo 0,5 da escala McFarland. As microplacas foram incubadas a 35-37°C e após 24-48H as leituras foram realizadas para verificar o crescimento fúngico [32]. Paralelamente, foi realizado o controle de esterilidade e de viabilidade das cepas e os ensaios foram realizados em triplicata.

O ICIF foi calculado por meio da soma do $CIF^A + CIF^B$, onde A representa o antimicrobiano e B o produto teste. O CIF^A , por sua vez, foi calculado pela relação

CIM^A combinado/ CIM^A isolado, enquanto que o CIF^B = CIM^B combinado/ CIM^B isolado. O índice foi interpretado de acordo com os seguintes critérios: sinergismo (≤ 0.5), aditividade/indiferença ($>0,5$ a ≤ 4) ou antagonismo ($>4,0$) [33].

Inibição da formação do biofilme

O ensaio foi baseado na metodologia de Balasubramanian et al. [34], com modificações, e as análises realizadas em triplicata. Foram utilizadas placas de microdiluição para a incubação de 100 μ L de meio RPMI 1640 contendo diferentes concentrações (CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4) dos produtos testes (OE, citronelal, miconazol e clorexidina) e 10 μ L do inóculo de *C. abicans* (ATCC 76485 e LM 4). Para o controle negativo, apenas o meio de cultura e inóculo foram utilizados. Após o intervalo de 48h de incubação estática a 35-37°C, o conteúdo dos poços foi devidamente descartado e delicadamente lavados com água destilada estéril para remoção de qualquer crescimento planctônico (células não aderidas), e logo em seguida foram conservados para secagem em temperatura ambiente. Após secagem, foram transferidos 140 μ L de solução de cristal violeta a 1% (NEWPROV[®]) repousando pelo tempo de 40 minutos. Em seguida o corante foi desprezado e utilizou-se água destilada para remoção dos excessos nas paredes dos poços e após estarem secos, receberam 140 μ L de etanol absoluto (RIOQUÍMICA[®]) para fixação. Após o período de 30 minutos em repouso, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro de microplacas (Multiskan GO) à 590nm.

Ruptura do biofilme pré-formado

A capacidade de ruptura do biofilme pré-formado utilizando os produtos testes foi avaliada seguindo a metodologia descrita por Rajasekharan et al. [35], com modificações, e as análises realizadas em triplicata. Foram incubados, em placas de microdiluição, 10 μ L de inóculo fúngico (ATCC 76485 e LM 4) e 100 μ L de meio RPMI 1640, estaticamente, durante 48h a 35-37°C para formação do biofilme. Em seguida, o conteúdo dos poços foi desprezado e foram novamente adicionados 100 μ L de meio RPMI 1640, desta vez com diferentes concentrações das substâncias teste (CIMx4, CIMx2, CIM, CIM/2, CIM/4) sendo novamente incubados durante 48h a 35-37°C, de forma estática. Para o controle negativo foram utilizados apenas o meio de cultura e inóculo. Logo após, foi realizada a coloração do biofilme com cristal violeta a 1% e solubilização em etanol absoluto, seguida de leitura em espectrofotômetro de

microplacas (Multiskan GO) à 590nm utilizando-se a mesma metodologia descrita no item anterior. A porcentagem de ruptura do biofilme pré-formado foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % de ruptura do biofilme = $[(ABS_{590} \text{ controle} - ABS_{590} \text{ teste}) / ABS_{590} \text{ controle}] \times 100$.

Análise estatística

Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 8. Foi utilizada a análise two-way ANOVA com múltiplas comparações com pós teste de Tukey e intervalo de confiança de 95%.

Resultados

Perfil cromatográfico e identificação dos compostos

A caracterização do OE realizada por GC-MS demonstrou o citronelal (42.28%) com o componente majoritário, seguido do geraniol (16.78%) e citronelol (11.5%), conforme tabela 1.

Tabela 1. Caracterização do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS).

Peak#	R. Time	Area	Area%	Name
1	11.325	325607	0.09	Not identified
2	12.642	15117106	4.11	Limonene
3	12.743	287633	0.08	Not identified
4	13.004	41406524	11.25	2-Pyrrolidinone, 1-methyl-
5	13.646	1730599	0.47	Not identified
6	14.893	212980	0.06	Terpinolene
7	15.364	1731847	0.47	Linalool
8	16.480	96402	0.03	Not identified
9	16.982	5347603	1.45	Neoisopulegol
10	17.311	155568866	42.28	Citronellal
11	17.513	450454	0.12	Not identified
12	17.837	223762	0.06	Not identified
13	18.685	122632	0.03	Not identified
14	19.224	319936	0.09	n-Decanal
15	19.988	42297898	11.50	Citronellol
16	20.446	1090004	0.30	Neral
17	20.899	61746820	16.78	Geraniol
18	21.475	2805738	0.76	Geranial
19	24.210	4844686	1.32	Citronellyl acetate
20	24.622	388495	0.11	Eugenol
21	25.213	4013313	1.09	Geranyl propanoate
22	25.466	4508161	1.23	Elemene<beta>
23	26.331	236988	0.06	Not identified
24	27.398	209456	0.06	Not identified
25	28.111	363957	0.10	Murolene<gamma>
26	28.250	3380216	0.92	Germacrene D
27	28.675	347941	0.09	Amorpha-4, 7 (11) -diene
28	28.834	1032592	0.28	Murolene<alpha>
29	28.983	903603	0.25	Germacrene A
30	29.247	1199753	0.33	g-Cadinene
31	29.524	4143162	1.13	d-Cadinene
32	29.947	152199	0.04	a-Maalinene
33	30.286	4817409	1.31	Elemol
34	31.057	3169913	0.86	Germacrene D-4-ol
35	32.675	326613	0.09	Not identified
36	32.950	828952	0.23	Not identified
37	33.066	196126	0.05	Not identified
38	33.193	328783	0.09	Not identified
39	33.309	1254242	0.34	Not identified
40	33.691	203479	0.06	Viridiflorene
41	38.974	192027	0.05	Not identified
		367924477	100.02	

Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Os resultados da CIM e CFM dos produtos avaliados frente as cepas de *C. albicans* variaram entre 512 e 2 µg/mL conforme tabela 2. A CIM do OE, citronelal, miconazol e clorexidina capaz de inibir o crescimento de 100% das cepas foram, respectivamente, 256 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL e 8 µg/mL.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, citronelal, miconazol e clorexidina sobre cepas de *Candida albicans*

Cepas de <i>Candida albicans</i>	<i>C. nardus</i>		Citronelal		Miconazol		Clorexidina	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
ATCC 76485	256	512	128	256	2	2	2	2
LM 2B	64	64	64	128	2	2	4	4
LM 4	64	64	128	256	16	16	4	4
LM 9B	128	64	64	128	2	8	4	4
LM 9P	128	128	128	128	2	4	2	2
LM 12B	128	128	128	256	2	2	4	4
LM 12P	64	64	32	32	2	2	2	2
LM 13B	64	64	128	512	64	256	4	4
LM 19B	64	64	64	128	32	32	4	4
LM 19P	128	256	64	128	32	32	4	4
LM 62	128	256	64	256	128	512	8	8
LM 108	128	128	256	256	16	16	4	4
LM 122	128	512	256	256	4	4	2	2

Valores expressos em µg/mL

Ação do óleo essencial de *C. nardus* e citronelal sobre a parede e a membrana celular fúngica

O OE e citronelal foram avaliados diante das cepas de *C. albicans* ATCC 76485 e LM 4 com e sem a presença de sorbitol 0,8M e ergosterol 400µg/mL. Os resultados demonstraram que as CIM dos produtos permaneceram as mesmas na

presença do sorbitol, entretanto, aumentaram em 64 vezes na presença do ergosterol sugerindo sua atividade na membrana celular fúngica, conforme tabela 3.

Tabela 3. Efeito do óleo essencial de *C. nardus* e citronelal sobre as cepas de *C. albicans* (ATCC-76485 e LM-04) na ausência e presença de sorbitol 0, 8M e ergosterol 400µg / mL.

Cepas	<i>C. nardus</i>		Citronelal	
	CIM (µg/mL)		CIM (µg/mL)	
	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol	Ausência de sorbitol	Presença de sorbitol
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	256	256	128	128
<i>C. albicans</i> LM - 04	64	64	128	128
	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol	Ausência de ergosterol	Presença de ergosterol
<i>C. albicans</i> ATCC 76485	256	16384	128	8192
<i>C. albicans</i> LM - 04	64	4096	128	8192

CIM: Concentração inibitória mínima

Checkerboard

Os resultados do ICIF das associações do OE *C. nardus* e citronelal com o miconazol e clorexidina frente as cepas de ATCC 76485 e LM 4 (tabela 4) demonstraram que mais da metade das associações (05) foram interpretadas como aditividade/indiferentes o que demonstra a ausência de interação entre os produtos e as demais (03) apresentaram antagonismo, evidenciando que os efeitos de um ou de ambos os produtos são menores em associação do que quando aplicados individualmente.

Tabela 4. Associação do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* e citronelal com miconazol e clorexidina para determinação do índice de concentração inibitória fracionada (ICIF) – método checkerboard.

Cepas de <i>Candida albicans</i>	<i>C. nardus</i> - Miconazol	<i>C. nardus</i> - Clorexidina	Citronelal - Miconazol	Citronelal - Clorexidina
ICIF				
ATCC 76485	2,06	1,06	8,06	1,06
LM 4	0,56	4,06	8,06	2,06

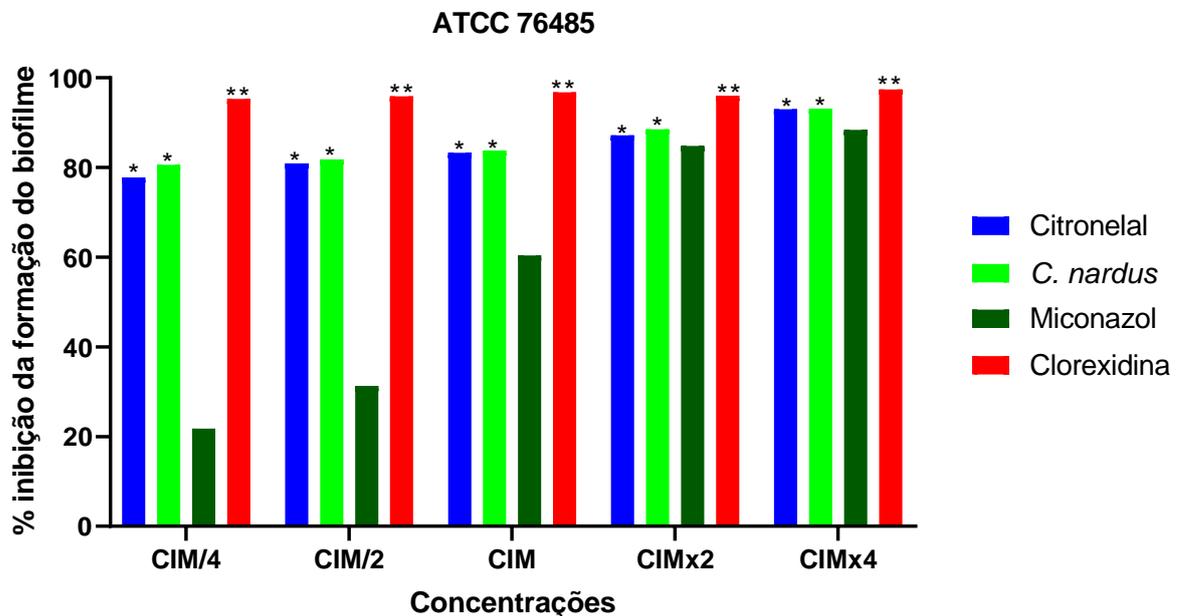
sinergismo ($\leq 0,5$), aditividade/indiferença ($>0,5$ a ≤ 4) ou antagonismo ($>4,0$)

Inibição da formação do biofilme e ruptura do biofilme pré formado

Os ensaios de inibição da formação do biofilme e ruptura do biofilme pré formado indicaram que os produtos avaliados, assim como o miconazol e a clorexidina, apresentaram atividade antibiofilme frente as cepas ATCC 76485 e LM 4.

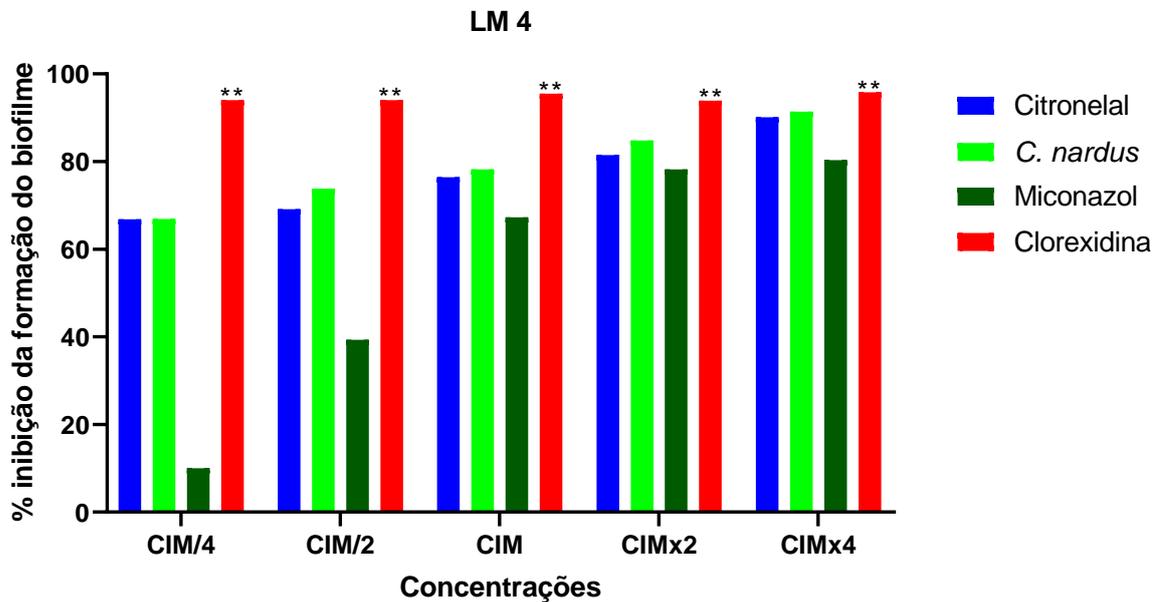
Na inibição da formação do biofilme, os resultados para ATCC 76485 demonstraram que o citronelal, OE e clorexidina, quando comparadas entre si, não obtiveram diferença estatisticamente significativa na inibição da formação do biofilme ($p>0,05$). Entretanto, quando comparadas ao miconazol apresentaram resultados significantes (Gráfico 1). Para a cepa LM 4, o citronelal e OE, em todas as concentrações avaliadas, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre si na inibição da formação do biofilme, bem como quando comparadas ao miconazol e clorexidina ($p>0,05$). A clorexidina, por sua vez, apresentou resultados significantes quando comparada ao miconazol (Gráfico 2).

Gráfico 1. Inibição da formação do biofilme frente a *Candida albicans* ATCC 76485 em diferentes concentrações



** $p<0,01$ (Clorexidina vs Miconazol); * $p<0,05$ (*C.nardus* vs Miconazol e Citronelal vs Miconazol).

Gráfico 2. Inibição da formação do biofilme frente a *Candida albicans* LM 4 em diferentes concentrações.



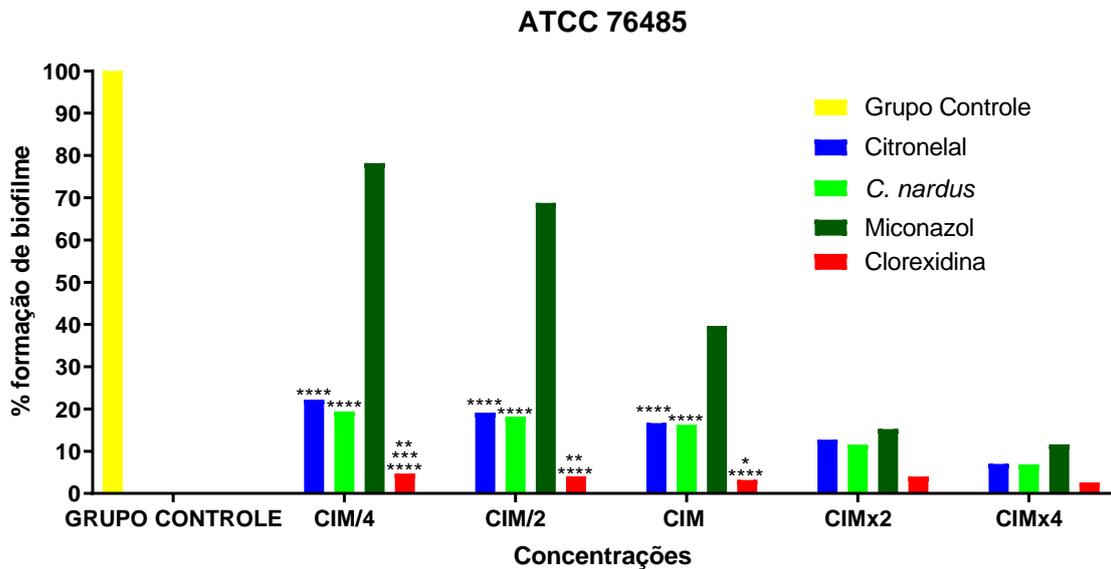
** $p < 0,01$ (Clorexidina vs Miconazol).

Para o ensaio da ruptura do biofilme pré-formado frente a cepa ATCC 76485 (Gráfico 3) o OE, citronelal e clorexidina foram superiores ao miconazol ($p < 0,0001$) na CIM/4, CIM/2 e CIM. Na CIM/4 a clorexidina ainda apresentou resultados significantes quando comparada ao citronelal ($p < 0,001$) e OE ($p < 0,01$). A clorexidina também apresentou melhores resultados em relação ao citronelal e OE na CIM/2 ($p < 0,01$) e CIM ($p < 0,05$). Entretanto, na CIMx2 e CIMx4 não houve diferença estatisticamente significante entre os produtos avaliados. O citronelal e OE, em todas as concentrações analisadas, não obtiveram diferenças quando comparados entre si.

Para a cepa LM 4 (Gráfico 4) o OE, citronelal e clorexidina foram superiores ao miconazol ($p < 0,0001$) na CIM/4 e CIM/2. Ainda na CIM/4, a clorexidina apresentou resultados significantes em relação ao OE e citronelal ($p < 0,0001$). Na CIM/2, a clorexidina apresentou resultados significantes quando comparada ao citronelal ($p < 0,0001$) e OE ($p < 0,001$). Na CIM, a clorexidina também foi superior ao miconazol ($p < 0,0001$), citronelal ($p < 0,001$) e OE ($p < 0,01$). Em relação a CIMx2 e CIMx4 a clorexidina obteve resultados significantes em relação ao miconazol ($p < 0,05$). O citronelal e OE não apresentaram diferenças estatisticamente significantes quando comparados ao miconazol (CIM, CIMx2 e CIMx4) bem como à

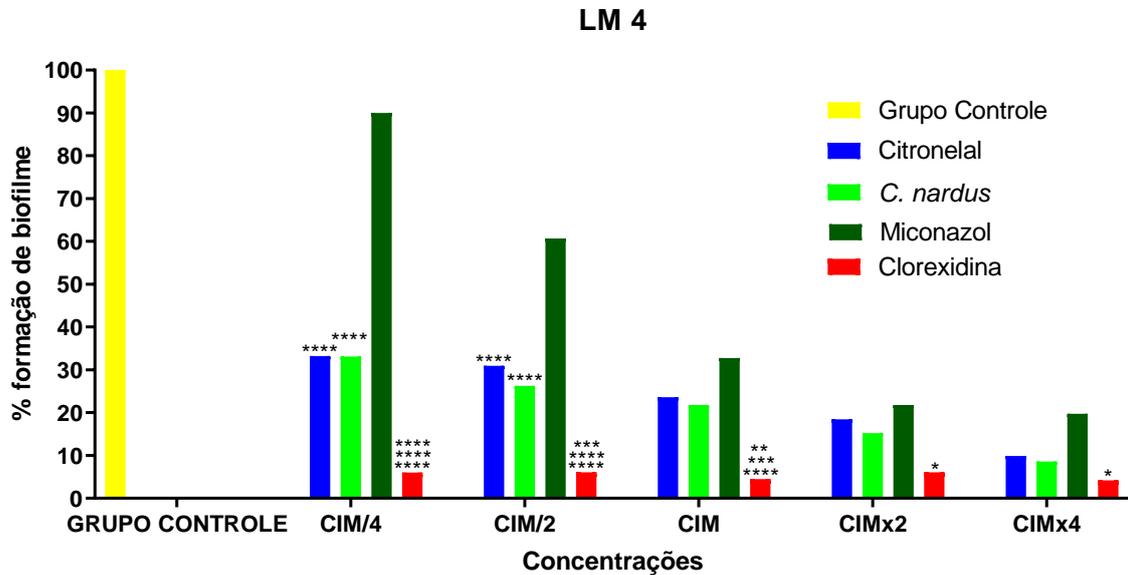
clorexidina (CIMx2 e CIMx4). O citronelal e OE, em todas as concentrações analisadas, não obtiveram diferenças quando comparados entre si.

Gráfico 3. Porcentagem de formação do biofilme frente a *Candida albicans* ATCC 76485 em diferentes concentrações.



CIM/4 – **** $p < 0,0001$ (Clorexidina vs Miconazol; Citronelal vs Miconazol; *C. nardus* vs Miconazol); *** $p < 0,001$ (Clorexidina vs Citronelal); ** $p < 0,01$ (Clorexidina vs *C. nardus*); **CIM/2** - **** $p < 0,0001$ (Clorexidina vs Miconazol; Citronelal vs Miconazol; *C. nardus* vs Miconazol); ** $p < 0,01$ (Clorexidina vs Citronelal; Clorexidina vs *C. nardus*); **CIM** - **** $p < 0,0001$ (Clorexidina vs Miconazol; Citronelal vs Miconazol; *C. nardus* vs Miconazol); * $p < 0,05$ (Clorexidina vs Citronelal; Clorexidina vs *C. nardus*).

Gráfico 4. Porcentagem de formação do biofilme frente a *Candida albicans* LM 4 em diferentes concentrações



CIM/4 – **** $p < 0,0001$ (Clorexidina vs Miconazol; Citronelal vs Miconazol; *C. nardus* vs Miconazol; Clorexidina vs Citronelal; Clorexidina vs *C. nardus*); **CIM/2** - **** $p < 0,0001$ (Clorexidina vs Miconazol; Citronelal vs Miconazol; *C. nardus* vs Miconazol; Clorexidina vs Citronelal); *** $p < 0,001$ (Clorexidina vs *C. nardus*); **CIM** - **** $p < 0,0001$ (Clorexidina vs Miconazol); *** $p < 0,001$ (Clorexidina vs Citronelal); ** $p < 0,01$ (Clorexidina vs *C. nardus*); **CIMx2** - * $p < 0,05$ (Clorexidina vs Miconazol); **CIMx4** – * $p < 0,05$ (Clorexidina vs Miconazol).

Discussão

A composição química do OE de *C. nardus* pode variar de acordo com os seguintes fatores: sua origem, estágio de desenvolvimento, condições climáticas e a parte da planta utilizada para a obtenção do óleo [36]. Várias pesquisas tem demonstrado que o terpenóide citronelal apresenta-se como componente majoritário do OE de *C. nardus* [37-40] corroborando com nosso estudo onde o citronelal está presente em 42.28% da composição do OE.

O presente estudo demonstrou que o OE e o fitoconstituente citronelal foram capazes de eliminar 100% das cepas na concentração de 512 µg/mL. Outros estudos tem demonstrado que essas concentrações podem variar entre 128 µg/mL a 1024 µg/mL [26,41] e essas diferenças podem ser atribuídas tanto à composição química do OE como os diferentes microrganismos utilizados nos estudos. A clorexidina por sua vez foi o produto que apresentou os melhores resultados de CIM e CFM, entretanto, quando utilizada de forma crônica pode desencadear efeitos adversos como alterações no paladar, descamação oral, gosto desagradável e pigmentação dos dentes [42,43]. Dessa forma, se torna interessante a busca por novos produtos, principalmente os de origem natural, a fim de verificar os possíveis efeitos adversos, toxicidade e tolerabilidade desses agentes.

O presente estudo sugere que o OE e citronelal apresentam atividade na membrana celular fúngica devido ao aumento considerável das CIMs na presença do ergosterol. O ergosterol é um dos principais componentes da membrana celular de *C. albicans* e em estudos anteriores foi observado uma diminuição acentuada dos níveis de ergosterol na presença do citronelal, também sugerindo atividade sobre a membrana celular fúngica [44, 45]. Em geral, os compostos lipofílicos presentes nos óleos essenciais atuam quebrando ou rompendo as membranas ocasionando perda de várias enzimas e nutrientes através da membrana celular [46,47].

O método *Checkerboard* analisa o efeito de combinações de agentes antimicrobianos com mecanismos de ação distintos no crescimento *in vitro* de microrganismos [48]. Essas combinações tem por finalidade expandir o espectro antimicrobiano, evitar o surgimento de microrganismos resistentes, minimizar a toxicidade e obter a atividade antimicrobiana sinérgica [49]. A associação de antimicrobianos com produtos naturais podem acentuar ou inibir os efeitos dos primeiros, ou ainda não interferir na ação esperada [50]. Os produtos utilizados nesse estudo, quando associados, apresentaram resultados indiferentes e

antagônicos demonstrando que suas associações não seriam benéficas para uso terapêutico provavelmente por apresentarem mecanismos de ação semelhantes.

Biofilmes de *Candida* costumam apresentar resistência aos medicamentos antifúngicos disponíveis no mercado [51,52]. Os biofilmes formados por *Candida* não-*albicans* também demonstram susceptibilidade reduzida a agentes antifúngicos [51,53] e a resistência ao biofilme associada a medicamentos é considerada um fenômeno multifatorial. Um estudo de susceptibilidade demonstrou que de 652 cepas clínicas isoladas de *Candida albicans*, 41.10% apresentaram resistência ao miconazol e 35,74% à nistatina [54].

Os resultados do presente estudo demonstraram que os produtos avaliados apresentaram importante atividade antibiofilme na inibição e ruptura do biofilme pré formado. Um estudo realizado por Guiotti et al. 2016 [55] demonstram que soluções para desinfecção à base de *C. nardus* foram eficazes na remoção do biofilme de *C. albicans*.

Os principais mecanismos responsáveis pela diminuição da susceptibilidade dos biofilmes de *Candida* aos antifúngicos incluem o sequestro dos medicamentos por uma matriz polimérica extracelular (EPM), aumento do efluxo de medicamentos, alta densidade celular, presença de células persistentes e ativação da via responsiva ao estresse [56-58].

Os OE exibem excelentes propriedades antimicrobianas, incluindo atividades anti-*Candida* e contra biofilmes resistentes à medicamentos [59-61]. Estudos anteriores demonstram que são necessárias concentrações maiores do que a CIM para se obter um efeito antibiofilme [62, 63]. Entretanto, neste estudo, biofilmes pré formados de *C. albicans* foram significativamente reduzidos com a utilização do OE e citronelal nas concentrações avaliadas. Ademais, na CIMx2 e CIMx4 o OE e citronelal foram semelhantes à clorexidina e miconazol na ruptura do biofilme pré formado apontando esses produtos como promissores para formulações farmacêuticas e estudos clínicos além de apresentarem baixo efeito citotóxico [64].

Conclusão

O OE e o fitoconstituente citronelal apresentaram atividade antifúngica inibindo 100% das cepas nas concentrações de 256 µg/mL. Os produtos avaliados sugerem atividade sobre a membrana celular fúngica e quando associados ao miconazol e/ou clorexidina não apresentaram atividade sinérgica. Ademais, apresentaram importante atividade antibiofilme, tanto na inibição quanto na ruptura do biofilme pré formado, apontando esses produtos como promissores para ensaios clínicos. Entretanto, ainda são necessários estudos complementares de biodisponibilidade e toxicidade para desenvolver aplicações clínicas para o uso dos produtos avaliados.

Conflito de interesse

Os autores declaram não haver conflito de interesse.

Referências

- 1 Monge RA, Roma'n E, Nombela C, Pla J. (2006) The MAP Kinase signal transduction network in *Candida albicans*. *Microbiology (Reading)*. 152:905-912
- 2 Ramage G, Saville SP, Thomas DP, López-Ribot JL (2005). *Candida* biofilms: an update. *Eukaryot. Cell* 4, 633–638
- 3 Höfs S, Mogavero S, Hube B (2016) Interaction of *Candida albicans* with host cells: virulence factors, host defense, escape strategies, and the microbiota. *J Microbiol.* 54(3):149-169
- 4 Mayer FL, Wilson D, Hube B (2013) *Candida albicans* pathogenicity mechanisms. *Virulence* 4:119–128
- 5 Seneviratne CJ, Jin L, Samaranayake LP (2008) Biofilm lifestyle of *Candida*: A mini review. *Oral Dis.* 14(7):582–590
- 6 Thein ZM, Samaranayake YH, Samaranayake LP (2006) Effect of oral bacteria on growth and survival of *Candida albicans* biofilms. *Arch Oral Biol.* 51:672-680
- 7 Kaur S, Soni S, Singh R (2017) Commensal and pathogen: *Candida albicans*. *Ann Geriatr Educ Med Sci.* 4:18–21
- 8 Rajendran R, Sherry L, Nile CJ, Sherriff A, Johnson EM, Hanson MF, Williams C, Munro CA, Jones BJ, Ramage G (2016). Biofilm formation is a risk factor for mortality in patients with *Candida albicans* bloodstream infection—Scotland, 2012–2013. *Clin Microbiol Infect.* 22(1):87–93
- 9 Ramage G, Martínez JP, López-Ribot JL (2006) *Candida* biofilms on implanted biomaterials: a clinically significant problem. *FEMS Yeast Res.* 6(7):979–986
- 10 Tsang CSP, Ng H, McMillan AS (2007) Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness. *Clin Oral Invest.* 11(4): 361–368
- 11 Niimi M, Firth NA, Cannon RD (2010) Antifungal drug resistance of oral fungi. *Odontology.* 98(1):15–25
- 12 Rautemaa R, Ramage G (2011) Oral candidosis--clinical challenges of a biofilm disease. *Crit Rev Microbiol.* 37(4):328–336

- 13 Ungureanu A, Gaman AE, Turculeanu A, Mitroi M, Drocas AI, Dobritoiu M, Alexandru DO, Vasile C (2016) Incidence and antifungal susceptibility of *Candida albicans* infections. *Curr Health Sci J.* 42(2):164-168
- 14 Carmo ES, Lima EO, Souza EL, Sousa FB (2008) Effect of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil on the growth and morphogenesis of some potentially pathogenic *Aspergillus* species. *Braz J Microbiol.* 39(1):91-97
- 15 Kuriyama T, Williams DW, Bagg J, Coulter WA, Ready D, Lewis, MAO (2005) *In vitro* susceptibility of oral *Candida* to seven antifungal agents. *Oral Microbiol Immunol.* 20(6):349-353
- 16 Torres SR, Peixoto CB, Caldas DM, Akiti T, Barreiros MGC, Uzeda M, Nucci M (2007) A prospective randomized trial to reduce oral *Candida* spp. colonization in patients with hyposalivation. *Braz Oral Res.* 21(2): 182-187
- 17 Wingeter MA, Guilhermetti E, Shinobu CS, Takaki I, Svidzinski TIE (2007) [Microbiological identification and *in vitro* sensitivity of *Candida* isolates from the oral cavity of HIV-positive individuals] *Rev Soc Bras Med Trop.* 40(3):272-276
- 18 Menendez A, Li F, Michalek SM, Kirk K, Makhija SK, Childers NK (2005) Comparative analysis of the antibacterial effects of combined mouthrinses on *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol Immunol.* 20(1):31-34
- 19 Castro HG, Barbosa ICA, Leal TCAB, Souza CM, Nazareno, AC (2007) Crescimento, teor e composição do óleo essencial de *Cymbopogon nardus* (L.). *Rev Bras PI Med.* 9(4):55-61
- 20 Beneti SC, Rosset E, Corazza ML, Frizzo CD, Luccio MD, Oliveira JV (2011) Fractionation of citronella (*Cymbopogon winterianus*) essential oil and concentrated orange oil phase by batch vacuum distillation. *J Food Eng.* 102:348–354
- 21 Man HC, Hamzah MH, Jamaludin H, Abidin ZZ (2012) Preliminary study: kinetics of oil extraction from citronella grass by ohmic heated hydro distillation. *APCBEE Procedia.* 3:124-128
- 22 Billerbeck VG, Roques CG, Bessièrè JM, Fonvieille JL, Dargent R (2001) Effects of *Cymbopogon nardus* (L.) W. Watson essential oil on the growth and morphogenesis of *Aspergillus niger*. *Can J Microbiol.* 47(1):9-17

- 23 Li WR, Shi QS, Ouyang YS, Chen YB, Duan SS (2013) Antifungal effects of citronela oil against *Aspergillus niger* ATCC 16404. *Appl Microbiol Biotechnol.* 97(16):7483-7492
- 24 Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM (2011) Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine.* 18(13):1181-1190
- 25 Delespaul Q, Billerbeck VG, Roques CG, Michel G (2000) The antifungal activity of essential oils as determined by different screening methods. *J Essent Oil Res.* 12:256-266
- 26 Trindade LA, Oliveira JA, Castro RD, Lima EO (2015) Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clin Oral Investig.* 19(9): 2223-2231
- 27 Cleeland R, Squires E (1991) Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections In: LORIAN, V. *Antibiotics in laboratory medicine.* 739-787
- 28 Hadacek F, Greger H (2000) Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochem Anal.* 11:137-147
- 29 Balouri M, Sadiki M, Ibsouda SK (2016) Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: a review. *J Pharm Anal.* 6(2): 71-79
- 30 Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R (1995) A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antibiot (Tokyo).* 48(4):306-310
- 31 Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S (2008) Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod.* 71(10):1720-1725
- 32 White RL, Burgess DS, Mandruru M, Bosso JA (1996) Comparison of three different *in vitro* methods of detecting synergy: time-kill, checkerboard and E-test. *Antimicrob Agents Chemother.* 40(8):1914-1918
- 33 Mackay ML, Milne K, Goul IM (2000) Comparison of methods for assessing synergic antibiotic interactions. *Int J Antimicrob Agents.* 15(2):125-129
- 34 Balasubramanian D, Schneper L, Merighi M, Smith R, Narasimhan G, Lory S, Mathee K (2012) The Regulatory Repertoire of *Pseudomonas aeruginosa*

- AmpC β -Lactamase Regulator AmpR Includes Virulence Genes. PLoS One. 7(3):e34067
- 35 Rajasekharan SK, Ramesh S, Satish AS, Lee J (2017) Antibiofilm and Anti- β -Lactamase Activities of Burdock Root Extract and Chlorogenic Acid against *Klebsiella pneumoniae*. J Microbiol Biotechnol. 27(3):542-551
- 36 Ozcan M, Erkmen O (2001) Antimicrobial activity of the essential oils of Turkish plant spices. Eur Food Res Technol 212(6):658–660
- 37 Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont JP, Nicod L (2009) In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. Bangladesh J Pharmacol 4(1):29–34
- 38 Kpoviessi S, Bero J, Agbani P, Gbaguidi F, Kpadonou-Kpoviessi B, Sinsin B, Accrombessi G, Frédéric M MM, Quetin-Leclercq J (2014) Chemical composition, cytotoxicity and in vitro antitrypanosomal and antiplasmodial activity of the essential oils of four *Cymbopogon* species from Benin. J Ethnopharmacol 151(1):652–659
- 39 Wei LS, Wee W (2013) Chemical composition and antimicrobial activity of *Cymbopogon nardus* citronella essential oil against systemic bacteria of aquatic animals. Iran J Microbiol 5(2):147–152
- 40 Roszaini K, NorAzah MA, Mailina J, Zaini S, Faridz ZM (2013) Toxicity and antitermite activity of the essential oils from *Cinnamomum camphora*, *Cymbopogon nardus*, *Melaleuca cajuputi* and *Dipterocarpus* sp. against *Coptotermes curvignathus*. Wood Sci Technol 47(6):1273–1284
- 41 Toledo LG, Ramos MA, Spósito L, Castilho EM, Pavan FR, Lopes EO, Zocolo GJ, Silva FAN, Soares TH, Santos AG, Bauab TM, Almeida MTG (2016) Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. Int J Mol Sci. 17(8):1252
- 42 Paraskevas S (2005) Randomized controlled clinical trials on agents used for chemical plaque control. Int J Dent Hyg 3(4):162–178
- 43 Gunsolley JC (2006) A meta-analysis of six-month studies of antiplaque and antigingivitis agents. J Am Dent Assoc 137:1649–1657
- 44 Singh S, Fatima Z, Hameed S (2016) Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. Rev Soc Bras Med Trop 49(4):465-472

- 45 Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM (2011) Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine* 18:1181-1190
- 46 Cowan MM (1999) Plant products as antimicrobial agents. *Clin Microbiol Rev* 12(4):564–582
- 47 Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, Wyllic SG (2000) The mode of antimicrobial action of essential oils of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J Appl Microbiol* 88(1):170–175
- 48 Jackson C, Agboke A, Nwoke V (2009) *In vitro* evaluation of antimicrobial activity of combinations of nystatin and *Euphorbia hirta* leaf extract against *Candida albicans* by the checkerboard method. *J Med Plant Res.* 3(9):666-669
- 49 Kumar SN, Siji JV, Nambisan B, Mohandas C (2012) Activity and synergistic interactions of stilbenes and antibiotic combinations against bacteria *in vitro*. *World J Microbiol Biotechnol.* 28(11):3143-3150
- 50 Nascimento GGF, Locatelli J, Freitas PC, Silva GL (2000) Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic resistant bacteria. *Braz J Microbiol.* 31:247-256
- 51 Ramage G, Rajendran R, Sherry L, Williams C (2012) Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol.* 2012:528521
- 52 Di Bonaventura G, Pompilio A, Picciani C, Iezzi M, D'Antonio D, Piccolomini R (2006) Biofilm formation by the emerging fungal pathogen *Trichosporon asahii*: development, architecture, and antifungal resistance. *Antimicrob Agents Chemother.* 50(10):3269-76
- 53 Desai JV, Mitchell AP, Andes DR (2014) Fungal biofilms, drug resistance, and recurrent infection. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 1(4):10
- 54 Ungureanu A, Gaman AE, Turculeanu A, Mitroi M, Drocas AI, Dobritoiu M, Alexandru DO, Vasile C. (2016) Incidence and Antifungal Susceptibility of *Candida Albicans* Infections. *Curr Health Sci J.* 42(2):164-168
- 55 Guiotti AM, Cunha BG, Paulini MB, Goiato MC, Dos Santos DM, Duque C, Caiaffa KS, Brandini DA, Narciso de Oliveira DT, Brizzotti NS, Gottardo de Almeida MT (2016) Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. *J Prosthet Dent.* 116(1):136-43

- 56 Mathe L, Van Dijck P (2013) Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. *Curr Gen.* 59(4):251-64
- 57 Fox EP, Bui CK, Nett JE, Hartoon N, Mui MC, Andes DR, Nobile CJ, Johnson AD (2015) An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. *Mol Microbiol.* 96(6):226-39
- 58 Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR (2013) Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol.* 8(10):1325-37
- 59 Devkatte AN, Zore GB, Karuppayil SM (2005) Potential of plant oils as inhibitors of *Candida albicans* growth. *FEMS Yeast Res.* 5(9):867-73
- 60 Tampieri MP, Galuppi R, Macchioni F, Carelle MS, Falcioni L, Cioni PL, Morelli I (2005) The inhibition of *Candida albicans* by selected essential oils and their major components. *Mycopathologia.* 159(3):339-45
- 61 Agarwal V, Lal P, Pruthi V (2008) Prevention of *Candida albicans* biofilm by plant oils. *Mycopathologia* 165(1):13-9
- 62 Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FA, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY (2017) *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res* 31:e-89
- 63 Douglas LJ (2003) *Candida* biofilms and their role in infection. *Trends Microbiol.* 11(1):30-36
- 64 Cunha BG, Duque C, Caiaffa KS, Massunari L, Catanoze IA, Santos DM, Oliveira SHP, Guiotti AM (2020) Cytotoxicity and antimicrobial effects of citronella oil (*Cymbopogon nardus*) and commercial mouthwashes on *S. aureus* and *C. albicans* biofilms in prosthetic materials. *Arch Oral Biol.* 109:104577