



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

PATRÍCIA MICHELLE NAGAI DE LIMA

**EFEITOS SINÉRGICOS ANTIMICROBIANOS DA COMBINAÇÃO DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE GERÂNIO E *LEMONGRASS* SOBRE
Streptococcus mutans, *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp.**

PATRÍCIA MICHELLE NAGAI DE LIMA

**EFEITOS SINÉRGICOS ANTIMICROBIANOS DA COMBINAÇÃO DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE GERÂNIO E *LEMONGRASS* SOBRE
Streptococcus mutans, *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciência e Tecnologia, Universidade Estadual Paulista (Unesp), Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-graduação em CIÊNCIAS APLICADAS À SAÚDE BUCAL.

Área: Microbiologia e Imunologia. Linha de pesquisa: Agentes antimicrobianos e métodos de controle para infecções de interesse médico-odontológico.

Orientadora: Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira
Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro

São José dos Campos

2022

Instituto de Ciência e Tecnologia [internet]. Normalização de tese e dissertação [acesso em 2022]. Disponível em <http://www.ict.unesp.br/biblioteca/normalizacao>

Apresentação gráfica e normalização de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço de Normalização de Documentos da Seção Técnica de Referência e Atendimento ao Usuário e Documentação (STRAUD).

Lima, Patrícia Michelle Nagai de
Efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação dos óleos essenciais de gerânio e lemongrass sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida spp.* / Patrícia Michelle Nagai de Lima. - São José dos Campos : [s.n.], 2022. 77 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Ciências Aplicadas à Saúde Bucal - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos, 2022.

Orientadora: Luciane Dias de Oliveira

Coorientadora: Maria Marcucci Ribeiro

1. Gerânio. 2. Lemongrass. 3. *Streptococcus mutans*. 4. *Candida*. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Oliveira, Luciane Dias de, orient. II. Ribeiro, Maria Marcucci, coorient. III. Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia, São José dos Campos. IV. Universidade Estadual Paulista 'Júlio de Mesquita Filho' - Unesp. V. Universidade Estadual Paulista (Unesp). VI. Título.

BANCA EXAMINADORA

Profa. Assoc. Luciane Dias de Oliveira (Orientadora)

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Liliana Scorzoni

Universidade Estadual Paulista (Unesp)

Instituto de Ciência e Tecnologia

Campus de São José dos Campos

Prof. Dr. Jorge Luiz Reis de Oliveira

Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Faculdade de Ciências da Saúde

Campus Urbanova

São José dos Campos, 18 de Fevereiro de 2022.

DEDICATÓRIA

Dedico este projeto a Deus que sempre me acompanhou em todos os momentos, que me ajudou a realizar este sonho e que sempre iluminou o meu caminho para que eu conseguisse chegar até aqui.

Obrigada Senhor, por mais uma vez segurar as minhas mãos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Mirian Tieme Nagai e José Carlos de Lima, pelo exemplo, pelo amor, pela confiança e por todo o apoio que me deram até aqui.

Agradeço a Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho” – UNESP pela oportunidade de crescimento que me foi dado.

À coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudo concedida no período de março/2020 a setembro/2020 (processo nº 88887.489648/2020-00) e de outubro/2020 a fevereiro/2022 (processo nº 88887.529143/2020-00). Sem este auxílio não teria sido possível me dedicar da forma como pude.

Agradeço a minha companheira de laboratório e amiga, Thais Cristine Pereira, que compartilhou comigo todo seu conhecimento e que foram fundamentais para a realização deste trabalho. E que além de tudo, me presenteou com uma companhia alegre todos os dias, de muitas risadas, muitos desabafos e muitos conselhos trocados. Obrigada por tudo.

Aos meus amigos e colegas Clarissa Maciel, Ana Carolina Silva, Carol Trefiglio, Vanessa Meccatti, Juliana Gonçale e Lucas de Paula Ramos.

Ao meu noivo, Fabrício Costa Tissi, à minha sogra, Nilceia Costa, e aos meus tios e familiares, por todo amor e apoio.

À minha orientadora, Luciane Dias de Oliveira, pela orientação, por compartilhar comigo a sua sabedoria, paciência e acolhimento.

SUMÁRIO

RESUMO.....	11
ABSTRACT	12
1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1 Fitoterapia	13
2.2 Óleos essenciais	15
2.3 <i>Streptococcus mutans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Candida spp.</i>	21
3 PROPOSIÇÃO	27
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1 Obtenção dos óleos essenciais e microrganismos.....	28
4.2 Microrganismos e condições de cultivo	28
4.3 Análise da atividade antimicrobiana	29
4.3.1 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos óleos essenciais isolados.....	29
4.3.2 Método de Microdiluição <i>Checkerboard</i> das associações dos óleos essenciais.....	31
4.4 Análise da atividade antibiofilme	33
4.4.1 Tratamento.....	34
4.4.2 Atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de MTT.....	34
4.5 Análise estatística.....	35
5 RESULTADOS.....	36
5.1 Atividade antimicrobiana pelo teste de microdiluição em caldo.....	36
5.2 Atividade antimicrobiana do efeito combinado dos Oes.....	37
5.3 Atividade antibiofilme dos óleos essenciais.....	37
6 DISCUSSÃO.....	50
7 CONCLUSÃO.....	60
REFERÊNCIAS.....	61

RESUMO

Lima PMN. Efeitos sinérgicos antimicrobianos da combinação dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp. [dissertação]. São José dos Campos (SP): Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Ciência e Tecnologia; 2022.

Com a crescente resistência antibacteriana e fúngica, é evidente a necessidade de desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos contra microrganismos de interesse médico-odontológico capazes de provocar infecções graves. Os óleos essenciais (OEs) vêm ganhando notoriedade na comunidade científica por apresentarem diversos benefícios, como atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Desta forma, o objetivo deste estudo é avaliar a atividade antimicrobiana dos OEs de *Pelargonium graveolens* (gerânio) e *Cymbopogon schoenanthus* (*lemongrass*), de forma isolada e combinada, sobre cepas de *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei*. Para isso, os valores da Concentração Microbicida Mínima (CMM) foram determinados pelo método de microdiluição em caldo preconizado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M27-A2 (*Candida* spp.) e M7-A6 (*S. mutans* e *S. aureus*). Já os efeitos combinados dos OEs foram avaliados pela técnica *checkerboard*. Para a mensuração da atividade antibiofilme foi utilizado o ensaio colorimétrico de MTT, evidenciando a atividade metabólica dos microrganismos, após 5 min e 24 h de contato com os OEs. Os dados obtidos nos testes *in vitro* obtiveram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey* (5%). Os resultados obtidos demonstraram que os OEs testados apresentaram atividade antimicrobiana sobre todas as cepas com valores de CMM variando entre 16 e 0,03%, sendo as cepas fúngicas as mais sensíveis ao tratamento. Quando combinados, os OEs apresentaram efeito aditivo ou sinérgico contra *S. aureus*. Em relação aos biofilmes monotípicos, ambos os OEs reduziram significativamente a formação de biofilme. Em geral, o tratamento por 24 h apresentou maior eficácia do que o tratamento de 5 min para a maioria dos microrganismos. Quando os OEs foram testados de forma combinada, estes promoveram redução do biofilme de *S. aureus* de até 27,3% no tratamento de 5 min e de até 93,3% no tratamento de 24 h. Concluiu-se que os OEs de gerânio e *lemongrass* apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica em cultura planctônica e em biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* apresentando potencial para serem utilizados para tratamento de infecções causadas por esses patógenos

Palavras-chave: gerânio; *lemongrass*; *Streptococcus mutans*; *Candida*; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

Lima PMN. Synergistic antimicrobial effect of geranium and lemongrass essential oils against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* and *Candida* spp. [dissertation]. São José dos Campos (SP): São Paulo State University (Unesp), Institute of Science and Technology; 2022.

With the increasing antibacterial and fungal resistance, the development of new antimicrobial agents against microorganisms of medical and dental interest capable of causing severe infections are required. Essential oils (EOs) have been gaining notoriety in the scientific community for their therapeutic benefits, such as antimicrobial and anti-inflammatory activity. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the EOs of *Pelargonium graveolens* (geranium) and *Cymbopogon schoenanthus* (lemongrass) in an isolated and combined form, against *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* and *Candida krusei*. For this, Minimum Microbicidal Concentration (CMM) values were determined by broth microdilution method recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), standard M27-A2 (*Candida* spp.) and M7-A6 (*S. mutans* and *S. aureus*). The combined effects of the EOs were evaluated using the checkerboard technique. To measure the antibiofilm activity, the MTT colorimetric assay was performed, showing the metabolic activity of the microorganisms, after 5 min and 24 h of contact with the EO. The data obtained in the *in vitro* tests presented normal distribution and were analyzed statistically by ANOVA and complemented by the Tukey method (5%). CMM results varied between 16 and 0,03%, with fungal strains being the most susceptible. The combined treatment with EOs presented additive and synergistic effects against *S. aureus*. Concerning monotypic biofilms, both EOs significantly reduced biofilm formation. Overall, 24 h treatment presented better effectiveness than 5 min treatment for most microorganisms. When the EOs were tested in combination, they promoted the reduction of *S. aureus* biofilm by up to 27,3% in the 5 min treatment and 93,3% in the 24 h treatment. Hence, the tested agents showed antimicrobial and antifungal activity in planktonic culture and in monotypic biofilms of *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* and *C. krusei*. Thus, EOs of geranium and lemongrass has potential as an alternative for the treatment of infectious diseases caused by these pathogens.

Keywords: geranium; lemongrass; *Streptococcus mutans*; *Candida*; *Staphylococcus aureus*.

1 INTRODUÇÃO

O uso indevido da terapia antibiótica aumenta cada vez mais o surgimento de genes resistentes a diferentes antibióticos e propiciando a manifestação de infecções causadas por cepas resistentes, afetando atuais e futuras gerações (Wencewicz, 2019). Ademais, o desenvolvimento de cepas multirresistentes têm dificultado, ou em alguns casos até impossibilitado o tratamento da infecção com antibióticos convencionais. Atualmente, medidas preventivas e terapias eficazes são escassas, havendo necessidade de desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (Frieri et al., 2017).

Extraídos de plantas aromáticas, os óleos essenciais (OEs) são empregados principalmente na indústria farmacêutica e cosmética. Com mais de 200 diferentes constituintes, apresentam diversos benefícios à saúde (Aziz et al., 2018; Dhakad et al., 2018). Dentre os benefícios, pode-se citar o exemplo do óleo essencial de eucalipto que tem ação antioxidante, antimicrobiana, antisséptico, ação sobre o trato respiratório e gastrointestinal, entre muitas outras ações biológicas que são descritas na literatura (Dhakad et al., 2018). Um outro exemplo é o óleo essencial de citronela, conhecido principalmente como repelente natural contra os mosquitos, também possui propriedades antimicrobiana, anti-helmíntico, cicatrizante, anticonvulsivante, etc (Sharma et al., 2019). Além disso, o óleo essencial de melaleuca, quando testado contra o vírus da herpes simples (tipo HSV-1 e HSV-2) apresentou atividade antiviral, inclusive contra cepas resistentes ao aciclovir, principal antiviral utilizado na terapia para infecção por herpes simples (Schnitzler, 2019). Gucwa et al. (2018) estudaram a ação fungicida e fungistática de seis óleos essenciais contra *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Descobriu-se que os OEs de tomilho, limão e cravo são capazes de agir sobre a membrana plasmática destes fungos além de influenciar no efluxo de íons potássio apresentando um ótimo potencial terapêutico contra infecções causadas por espécies de *Candida*.

Como destacado acima, muitos estudos com os óleos essenciais são encontrados na literatura para avaliar a possibilidade de seu uso para tratamento antimicrobiano. Assim sendo, torna-se de interesse analisar a atividade antimicrobiana e antibiofilme de diferentes OEs, com destaque para *Pelargonium graveolens*

(gerânio) e *Cymbopogon schoenanthus* (lemongrass).

O óleo essencial de gerânio (*P. graveolens*) é famoso por sua fragrância e, por isto, é bastante utilizado como um aromatizante (Bergman et al., 2020). Em um estudo recente, este OE foi submetido a testes antimicrobianos contra cepas clínicas multirresistentes de *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* e *Mycobacterium fortuitum*. Os resultados obtidos demonstraram um notável potencial antimicrobiano do OE de gerânio contra micobactérias (Kardan-Yamchi et al., 2020).

Apesar da escassez dos estudos com o OE de lemongrass (*C. schoenanthus*), também foi verificado e constatou-se o seu potencial terapêutico contra infecções. A ação antimicrobiana contra *S. aureus* foi demonstrada nos resultados de Yagi et al. (2016) e contra *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae* por Hashim et al. (2017). Segundo Piasecki et al. (2021), o constituinte citral presente em alguns OEs, como nos óleos do gênero *Cymbopogon*, é o principal responsável por conferir atividade antimicrobiana e, ainda segundo os autores, a espécie de *C. schoenanthus* é uma das plantas que apresenta altas concentrações desta molécula.

A cavidade oral apresenta um extenso microbioma. Um desequilíbrio no número destes, torna o indivíduo suscetível às doenças bucais e sistêmicas (Verma et al., 2018). Pensando na importância de um antimicrobiano inovador para a área da odontologia, foram selecionados os seguintes microrganismos para este estudo: *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans*, *Candida dubliniensis* e *Candida krusei*.

A cárie dentária é uma das doenças crônicas infecciosas mais prevalentes no mundo (Selwitz et al., 2007) e nos casos mais severos pode levar à perda do elemento dentário (Clark, Levin, 2019). Capaz de se instalar em indivíduos de todas as idades, a cárie afeta a qualidade de vida do indivíduo e está fortemente associado às condições socioeconômicas (Chaffee et al., 2017; Kramer et al., 2018). A doença é causada pela formação de biofilme bacteriano e tem caráter oportunista. O alto índice da doença cárie tem levado à pesquisa de métodos de prevenção na formação de biofilme de *S. mutans*, bactéria considerada como um dos principais agentes cariogênicos (Jiang et al., 2018; Scharnow et al., 2019). Além disso, há relato de identificação de cepas de *S. mutans* em casos de endocardite bacteriana, ao qual essa bactéria foi apontada como um causador indireto da doença e que corroborou para o surgimento de outras cepas bacterianas no endocárdio (Lemos et al., 2019).

Staphylococcus aureus é uma bactéria zoonótica comensal oportunista presente na mucosa nasal e na pele e, eventualmente, pode ser encontrada na cavidade oral (Lima et al., 2019; Zhou et al., 2018). Na odontologia, *S. aureus* se destaca por sua habilidade em formar agregados com *Fusobacterium nucleatum*, que exerce um importante papel no biofilme oral por apresentar relação de sinergismo com outras bactérias. *S. aureus* também interage com *Porphyromonas gingivalis*, que é considerado um dos principais agentes patogênicos da periodontite (Lima et al., 2019; Mohanty et al., 2019). Já na medicina, esta bactéria pode provocar osteomielite, pneumonia, endocardite, entre outros (Guo et al., 2020). O surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes à alguns agentes antimicrobianos, como à vancomicina e à meticilina, desperta uma preocupação mundial pois esta problemática torna difícil o controle das infecções causadas por estes microrganismos (Guo et al., 2020; McGuinness et al., 2017; Mohammed et al., 2018).

Tendo como seu agente patogênico as espécies de *Candida*, a candidíase é a doença infecciosa fúngica mais comum nos seres humanos. Esses microrganismos são colonizadores comensal da mucosa oral e sua infecção tem caráter oportunista. Assim, acomete principalmente pacientes idosos e/ou imunossuprimidos, como aqueles com leucemia, diabetes, HIV+/AIDS, assim como pacientes que fazem uso crônico ou prolongado de anti-inflamatório esteroidal, antibióticos, quimioterapia ou radioterapia (Mohamed et al., 2019; Rodrigues et al., 2019). Esta infecção muitas vezes se dá por características assintomáticas, mas também pode trazer grandes desconfortos para o paciente, como na candidíase esofágica, por exemplo. Alguns sintomas relatados por indivíduos infectados foram: dor e dificuldade durante a deglutição e dor na região do osso esterno. Nos casos assintomáticos, a grande preocupação é o risco maior da doença evoluir para um caso de fungemia, muitas vezes podendo levar o paciente ao óbito (Lohse et al., 2018; Mohamed et al., 2019).

Para a manifestação clínica da candidíase é necessária a formação de biofilme, ou seja, uma comunidade de fungos do gênero *Candida*, aderidos a uma matriz extracelular (Kernien et al., 2018). A dificuldade no tratamento da infecção se dá por conta de os agentes antifúngicos atuais apresentarem um alto custo e alta toxicidade. Além da problemática da resistência antifúngica que essa espécie tem desenvolvido (Chen et al., 2020; Li et al., 2018; Lohse et al., 2018).

A principal problemática no tratamento dessa infecção é o crescente

surgimento de cepas resistentes aos antifúngicos existentes, além da alta toxicidade que estes fármacos apresentam. Com isto, estudos com terapias alternativas para o tratamento da candidíase tem se intensificado. Alguns exemplos são os tratamentos com terapia fotodinâmica, colutórios e estudo com produtos de origem natural, como probióticos e extratos de plantas (Rodrigues et al., 2019).

Candida albicans é a espécie de *Candida* mais prevalente nos seres humanos e conseqüentemente é a principal espécie presente nos casos de candidíase, com alta taxa de mortalidade em condições mais invasivas. A dificuldade no tratamento da infecção se dá por conta de os agentes antifúngicos atuais apresentarem um alto custo e alta toxicidade. Além da problemática da resistência antifúngica que essa espécie tem desenvolvido (Chen et al., 2020; Li et al., 2018; Lohse et al., 2018). No entanto, as espécies não-albicans também chamam a atenção da comunidade médica e científica, pois estas têm sido relacionadas a casos de disseminação (Barac et al., 2020). *Candida dubliniensis* também faz parte do gênero *Candida*, e tem apresentado uma resistência à flucitosina e uma baixa suscetibilidade aos azóis (Asadzadeh et al., 2018). Existem relatos de casos de meningite causada por *C. dubliniensis* em pacientes imunossuprimidos (Tahir et al., 2020). Ademais, uma das espécies de *Candida* mais invasiva é *Candida krusei* e, no mundo todo, é a que mais está relacionada a casos de fungemia (Faria et al., 2020). Em um estudo recente, identificou-se um surto de casos de fungemia causada por *C. krusei* em pacientes pediátricos em um hospital localizado na Índia (Kaur et al., 2020). O grande desafio no tratamento desta candidemia é a crescente resistência antifúngica e reduzida suscetibilidade aos antifúngicos existentes (Faria et al., 2020).

Logo, é evidente o surgimento de microrganismos resistentes aos fármacos atuais e se faz imprescindível o investimento em estudos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos. Deste modo torna-se de grande importância avaliar a atividade antimicrobiana, incluindo a análise da ação antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *C. albicans*, *C. dubliniensis*, *C. krusei*, *S. mutans* e *S. aureus*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fitoterapia

A fitoterapia é um ramo da medicina que com o passar dos anos têm ganhado popularidade. Por tanto, se faz necessário para um bom profissional da área da saúde, conhecer esta terapia alternativa. A fitoterapia se baseia na utilização de plantas medicinais para a promoção da saúde (tratamento e prevenção). Para tanto, a planta deve ser utilizada em sua composição total ou em uma porcentagem mínima sem adulterações de seus componentes. Seu uso na medicina pode ser de forma isolada, ou seja, apenas uma planta, pode ser de forma combinada com outras plantas que apresentam propriedades complementares uma à outra, ou até mesmo, pode ser utilizada como complemento à outros fármacos não fitoterápicos (Falzon, Balabanova, 2017).

No Brasil, foi avaliado o uso da terapia com plantas medicinais dentro do programa de atenção primária, a porta de entrada do Sistema Único de Saúde (SUS). Deste modo, foram levantados artigos publicados entre 1988 e 2013 com esta pauta. Os resultados mostraram que durante estes 25 anos houve um pequeno aumento nas publicações científicas sobre o referido. Ainda assim, a fitoterapia na atenção primária serviu como um grande aliado para promoção da interação entre paciente e profissional, contribuiu para o desenvolvimento do pensamento crítico de ambos os lados em relação ao uso apropriado da fitoterapia e também, contribuiu para a disseminação do conhecimento científico sobre este, para a população em geral (Antonio et al., 2014).

As propriedades biológicas do extrato de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) foram analisadas contra microrganismos de interesse médico-odontológico: *C. albicans*, *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *S. mutans* e *Pseudomonas aeruginosa*. No estudo da citotoxicidade, verificou-se uma viabilidade celular acima de 50% quando as células (macrófagos, fibroblastos gengivais e células tumorais) foram tratadas com concentrações do extrato menor ou igual a 50 mg/mL. *R. officinalis* mostrou efetividade contra os biofilmes mono e polimicrobianos e ainda, constatou-se

uma excelente atividade anti-inflamatória através da redução da síntese de citocinas pró-inflamatórias (de Oliveira et al., 2017).

Com a problemática atual da pandemia de COVID-19, foram levantadas evidências científicas no uso de plantas medicinais para o tratamento coadjuvante dos sintomas da doença. Com isto, 39 plantas foram apontadas com potencial terapêutico para pacientes infectados pelo vírus. Já quando avaliado o risco-benefício, 5 plantas foram selecionadas com resultados positivos: *Althaea officinalis* (malva-branca), *Commiphora molmol* (mirra), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Hedera Helix* (hera trepadeira) e *Sambucus nigra* (sabugueiro preto) e outras 12 plantas foram classificadas como promissoras para o tratamento dos sintomas. O levantamento ainda encontrou resultados sugestivos de que muitas destas plantas apresentam uma margem de segurança maior do que os fármacos de referência (Silveira et al., 2020).

Na odontologia, as lesões orais mais comuns, apresentam etiologia microbiana/infecciosa, ou traumática. No entanto, também podem se manifestar por doenças sistêmicas ou uso excessivo do álcool e tabaco. Com esta diversidade de fatores desencadeantes, o uso de agentes fitoterápicos pode controlar as lesões por meio de diferentes mecanismos que muitas plantas apresentam, como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, antisséptica e anti-carcinogênica, por exemplo (Salehi et al., 2019). Apesar da pouca disponibilidade de artigos com fitoterápico na área da odontologia, é possível encontrar estudos que demonstram resultados promissores, os quais serão descritos abaixo.

Em um estudo *in vitro*, Veloso et al. (2020) avaliaram extratos de *Caesalpinia férrea* Mart (pau-ferro), *Cinnamomum cassia* (canela), *Mallow sylvestris* L. (malva), *Punica granatum* L. (romã), *Rosmarinus officinalis* L. (alecrim), *Aeollanthus suaveolens* (macassá), *Spreng* (cavalinha), *Syzygium aromaticum* L. (cravo-da-Índia), e *Tamarindus indica* L. (tamarindo) contra microrganismos orais anaeróbios, produtores de compostos de enxofre voláteis, fator etiológico da halitose. Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos, foram semeadas cepas clínicas de *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia* e *Parvimonas micra*. Para tanto, utilizaram-se do método de difusão em ágar, no qual a zona de inibição é medida. Nos resultados, o extrato de romã foi o único extrato a apresentar zona de inibição para todas as cepas e ainda, foi o que apresentou a maior zona de inibição para *P. micra*. Também foi realizada o método

de microdiluição em caldo para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), no qual os valores de CIM para todos os extratos foram maiores que 400 µg/mL, exceto para *P. intermedia* que, o extrato de romã obteve valor de CIM de 160 µg/mL. Já no teste de Concentração Microbicida Mínima, os extratos de alecrim, canela, cravo-da-Índia, macassá e malva, exibiram ação bactericida contra *P. gingivalis*. Assim, com esses resultados os autores puderam demonstrar por meio de dados estatísticos, que os extratos possuem um potencial de redução dos microrganismos testados.

Outro exemplo é o alcaçuz, que é uma planta com propriedades anti-inflamatória, antiulcerativa, anticarcinogênica, antiviral, dentre outros. No quesito às lesões orais, esta planta mostrou benefícios para o tratamento de cáries, doenças periodontais, úlceras e câncer oral, entretanto, é importante ressaltar que constatou-se a necessidade de mais estudos *in vivo*, assim como, estudos para avaliar a sua efetividade como medicação ou irrigante durante o tratamento endodôntico (Sidhu et al., 2020).

Recentemente foi publicada uma pesquisa com *Porphyromonas gingivalis*, principal bactéria patogênica da doença periodontal e extratos de plantas. Neste, foram avaliadas a citotoxicidade do extrato sobre células de queratinócitos humanos e a atividade antimicrobiana contra *P. gingivalis*. Foram selecionados 109 extratos derivados de diferentes partes de 21 espécies de plantas. Destes, 8 espécies de plantas mostraram atividade antibacteriana (*Vicia faba*, *Carya alba*, *Juglans regia*, *Citrus sinensis*, *Zanthoxylum armatum*, *Morella cerifera*, *Sassafras albidum* e *Pistacia lentiscus*) contra *P. gingivalis*. Os valores de CIM variaram entre 8 e 128 µg/mL, sendo que a menor concentração, de 8 µg/mL foi para o extrato aquoso proveniente do fruto de *Pistacia lentiscus* (aroeira) (Carrol et al., 2020).

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OEs) derivam de sementes, plantas, madeiras, raízes, frutas e cascas. É comumente utilizada para aromaterapia que consiste em uma terapia alternativa no ramo da medicina e pode ser aliado a tratamentos

convencionais. O benefício deste tipo de tratamento se dá pelo controle de sintomas como dor, náusea, ansiedade, depressão, estresse, insônia e doenças respiratórias. Por conta destes sintomas, pode ser bastante indicado para certas condições médicas, por exemplo, pacientes oncológicos (Farrar, Farrar, 2020).

O óleo essencial de melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), por exemplo, tem excelente atividade antimicrobiana e anti-inflamatória conhecida. Entretanto, seu uso de forma tópica tem sido relacionado, mesmo em concentrações baixas, com efeitos adversos, como por exemplo a dermatite por contato. Por esta razão é essencial o estudo de toxicidade mesmo de produtos de origem natural (Halcón, Milkus, 2004).

Considerando a crescente manifestação de microrganismos resistentes aos antimicrobianos convencionais, os OEs vêm ganhando espaço dentro das pesquisas como um novo agente para o tratamento de doenças infecciosas (Brochot et al., 2017). Brochot et al. (2017) avaliaram a atividade antimicrobiana dos OEs de *Cinnamomum zeylanicum* (caneleira de Cássia), *Daucus carota* (cenoura), *Eucalyptus globulus* (eucalipto) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim), de forma combinada, sobre 14 cepas bacteriana padrão ATCC: *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacteriodes fragilis*, *Haemophilus influenza* e *Branhamella catarrhalis*. Também foram testados sobre cepas fúngicas de *Candida albicans*, *Candida glabrata* e *Candida tropicalis* (padrão ATCC). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) variou entre 0,01% e 3% e a Concentração Mínima Microbicida (CMM) variou entre <0,01% e 6% para as cepas bacterianas. Já para as cepas de *Candida*, os valores de CIM variaram entre 0,01 a 0,05% e CMM, entre 0,02 a 0,05%. Com estas concentrações baixas, a mistura dos OEs se mostrou conveniente para a sua utilização no combate às infecções.

Aleksandra et al. (2018) estudaram o potencial antifúngico do OE de *Myrtus communis* (murta) contra *Malassezia* spp., isolado da pele de pacientes portadores de pitíriase versicolor. Este óleo mostrou grande potencial de inibição do crescimento fúngico, que variou entre 62 a 96% de redução, variando de acordo com a espécie. O OE também exibiu valores de CIM e CMM sobre todas as cepas testadas.

Rosmarinus officinalis L. (alecrim), é uma planta bastante estudada por pesquisadores para sua utilização na medicina, pela sua conhecida ação anti-

inflamatória. Quando estudada em forma de óleo essencial, foi observada que esta ação anti-inflamatória se dá principalmente pela supressão da cascata do ácido araquidônico. Ainda, o OE de alecrim apresenta ação antioxidante, que auxilia na prevenção de danos causados pela inflamação. Apesar do seu benefício ser bem evidenciado cientificamente, constata-se uma escassez nos estudos direcionado para inflamação crônica, sem falar da inexistência de estudos clínicos (Borges et al., 2019).

Para avaliar a atividade antibacteriana sobre microrganismos resistentes, Kozics et al. (2019) selecionaram os seguintes óleos essenciais: *lemongrass* (*Cymbopogon flexuosus*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), eucalipto (*Eucalyptus radiata*), lavanda (*Lavandula angustifolia*), tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo (*Eugenia caryophyllata*), orégano (*Origanum vulgare*), cássia (*Cinnamomum cassia*), arborvitae (*Thuja plicata*) e sálvia (*Salvia sclarea*), para serem estudados contra microrganismos isolados de infecções de pele. Os microrganismos coletados que apresentaram resistência antimicrobiana foram: *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*. Os OEs de orégano, cássia, capim-limão, arbovitae e tomilho foram os melhores óleos com ação antimicrobiana contra as cepas estudadas. Para o teste de genotoxicidade, os OEs também se mostraram de uso seguro quando testados sobre células da linhagem HaCaT (queratinócito humano).

Dentre os diversos óleos essenciais disponíveis, destacam-se o interesse pelo OE de *Pelargonium graveolens* (gerânio) e *Cymbopogon schoenanthus* (lemongrass).

Pelargonium graveolens pertence à família *Geraniaceae*. Avaliando a composição fitoquímica do OE de *P. graveolens* coletado na Tunísia, foram encontrados 42 compostos, dentre eles, geraniol e citronelol. Avaliando sua ação antimicrobiana contra uma diversidade de fungos e bactérias, como *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Salmonella entérica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Listeria monocytogenes*, *Alternaria alternata* e *Fusarium oxysporum*, o OE de gerânio apresentou zonas de inibição que variaram entre 13 e 26 mm de diâmetro, sendo *B. cereus* um dos mais sensíveis ao tratamento dentre as cepas bacterianas. Já o diâmetro da zona de inibição das cepas fúngicas variaram entre 24 e 34 mm, se mostrando mais efetivo ainda, como um potencial antifúngico (Hsouna, Hamdi, 2012).

Pensando na problemática dos microrganismos resistentes, Malik et al. (2011) avaliaram a associação do OE de *P. graveolens* com o antimicrobiano

ciprofloxacino contra os microrganismos *K. pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e *S. aureus*. A combinação do fármaco com o OE resultou em valores de sinergismo contra todas as cepas testadas, despertando a possibilidade de sua utilização para tratamento de infecções causadas por esses agentes patogênicos em associação com o antimicrobiano.

O OE de gerânio foi analisado sobre cepas clínicas de *Enterococcus faecalis*, coletado de dentes endodonticamente tratados. Para determinação da CIM foi utilizado o método de microdiluição em placa. Já o teste para a análise da atividade antimicrobiana em biofilme foi feito em blocos de dentina. As concentrações de CIM variaram entre 1,8 a 4,5 mg/mL. Estes valores não demonstraram citotoxicidade em células endoteliais (linhagem celular HMEC-1), pelo teste de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide). O OE mostrou atividade antimicrobiana em biofilme, na concentração de 150 mg/mL. Assim, o OE de gerânio se mostrou eficaz contra *Enterococcus* spp., sendo um agente promissor para uso em infecções endodônticas (Łysakowska et al., 2015).

Boukhatem et al. (2021) avaliaram a ação antioxidante, anti-inflamatória e anticâncer do OE de *Pelargonium graveolens*. A composição química do OE foi determinada através da análise cromatográfica, onde constatou-se que o citronelol era o seu constituinte principal. A ação antioxidante apresentou resultado estatisticamente melhor quando comparado ao grupo controle, o ácido ascórbico e o hidroxianisol butilado. Além disso apresentou ótimo potencial anti-inflamatório. Na avaliação *in ovo*, utilizaram-se uma membrana cório-alantóide (CAM) de ovos de galinha para avaliar a ação anticâncer. Esta ação foi estudada através da observação do processo de angiogênese e proliferação celular. O OE demonstrou redução significativa em ambos os processos. Por fim, para avaliação da citotoxicidade, foram utilizadas células da linhagem de câncer de mama metastático (MDA-MB-231), gástrico (AGS) e de melanoma (MV3). A redução da taxa de viabilidade celular foi dose dependente, sendo que o OE demonstrou melhor citotoxicidade sobre células da linhagem AGS. Assim, os autores puderam concluir que o OE de gerânio tem um potencial terapêutico sobre células cancerígenas, dada sua atividade antiangiogênica, anti-inflamatória e antiproliferativa.

Cymbopogon schoenanthus é uma planta aromática da família *Poaceae* (Malti et al., 2020) e o seu óleo essencial é utilizado no mundo todo na área da saúde (Morris,

2021). Os OEs do gênero *Cymbopogon* são conhecidos pela presença do citral (neral e geranial) que por sua vez é frequentemente citado pela sua atividade antimicrobiana (Piasecki et al., 2021). Vale ressaltar que a composição química dos OEs tendem a variar de acordo com o local da colheita (Malti et al., 2020) o que por sua vez pode resultar em diferentes efetividades das atividades biológicas de OEs de uma mesma planta, colhida em regiões distintas.

É possível encontrar diferentes tipos de plantas do gênero *Cymbopogon*, como *C. nardus*, *C. citratus*, *C. flexuosus*, *C. schoenanthus*, entre outros (Piasecki et al., 2021). *C. citratus*, por exemplo, tem utilização na medicina, cosmetologia e nutrição devido a suas propriedades biológicas. Tanto o extrato, quanto o óleo essencial desta espécie apresentam uma farmacocinética semelhante, sendo bem absorvido pelo organismo quando administrado por via oral, pulmonar e tópica. Mas vale ressaltar que os componentes desta planta, quando chegam ao intestino, sofrem grandes alterações. Esta informação é essencialmente importante para considerar a industrialização de um fármaco por via oral. Já a sua excreção foi identificada nas fezes, urina e através das vias aéreas. Estas informações devem ser confirmadas em estudos em seres humanos (Ekpenyong et al., 2015).

OE de *lemongrass* (*Cymbopogon citratus*) foi testado sobre bactérias colonizadores da superfície dental por Oliveira et al. (2017). As espécies utilizadas na análise foram *Actinomyces naeslundii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Streptococcus gordonii*, *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. sobrinus*. No teste de difusão em ágar, os halos de inibição mediram diâmetros entre 8 e 16mm. Todas as cepas apresentaram valores de CIM que variaram entre 1,32 a 2,61 mg/mL⁻¹. O OE de *C. citratus* demonstrou atividade bactericida e bacteriostática contra todas as cepas clínicas de *S. mutans* e *L. acidophilus*. Já a atividade de viabilidade celular sobre biofilme de *S. mutans* e *L. acidophilus* foi reduzida na concentração 10 X CIM. Comparando a redução de células aderentes (em dentes) entre o OE e o digluconato de clorexidina (0,12%), os percentuais de redução foram 100% e 69%, respectivamente, quando em contato por 1 minuto. Para análise da citotoxicidade foram utilizadas células queratinócitos humanos (HaCaT). A viabilidade celular na maior concentração testada (25 mg/mL) foi de 85%. Já no valor mínimo testado (0,25 mg/mL), a viabilidade foi de 98%.

Venzon et al. (2018) avaliaram o efeito do óleo essencial de *lemongrass*

(*Cymbopogon citratus*) sobre a mucosa gástrica de ratos. Para tanto, foram induzidas ulcerações gástricas aguda e crônica provocadas por etanol e ácido acético, respectivamente. Para o tratamento dos animais com úlcera induzida por etanol, o OE apresentou dose mínima efetiva de 10 mg/kg e a lesão apresentou redução em área em 51,67%. Ainda, o óleo mostrou efeito gastroprotetor dose- dependente. Já nos ratos com úlceras induzida por ácido acético, foi possível analisar o efeito cicatrizante do *lemongrass*, no qual, na concentração de 10 mg/kg, a extensão da lesão foi reduzida em 34,52%. O OE de *Cymbopogon citratus* também foi avaliado sobre a formação de biofilme monotípico de *Candida tropicalis*. Os autores descobriram que este fungo tem maior facilidade de produção de biofilme sobre material hidrofóbico do que hidrofílico. Quando o OE foi empregado sobre a superfície de silicone, o mesmo foi capaz de reduzir em até 76% o biofilme de *C. tropicalis*, mostrando um ótimo potencial antifúngico (Sahal et al., 2020).

O OE de *C. citratus* indicou uma excelente propriedade ansiolítica quando testado *in vivo*. *C. citratus* foi administrado no modelo animal *zebrafish* nas seguintes formulações: óleo essencial, extrato hidroalcoólico, citral (composto isolado) e geraniol (composto isolado). Todos os grupos testados apresentaram propriedade ansiolítica. Os resultados sugerem o envolvimento dos receptores GABAérgicos para esta resposta e abre portas para uma nova possibilidade no tratamento de doenças psicológicas (Hacke et al., 2020).

Uma outra espécie de *lemongrass*, o óleo essencial de *C. flexuosus* também é conhecido por sua ação antimicrobiana. Sua atividade anticancerígena foi avaliada sobre a expressão gênica do gene HS90, um dos principais responsáveis pelo desenvolvimento do câncer. A citotoxicidade do OE foi avaliada sobre as linhagens celulares humana de câncer de mama e embrionária. Interessantemente, o OE foi mais tóxico à célula de câncer de mama do que à célula embrionária. A expressão gênica foi estudada através do RT-qPCR (Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real), que possibilitou a identificação da supressão do gene HS90 dada pela utilização do OE de *C. flexuosus* (Gaonkar et al., 2018).

Bossou et al. (2013) confirmaram o poder inseticida de *lemongrass*. O OE de *C. schoenanthus* foi colocado em contato com larvas de *Anopheles gambiae* para verificar sua eficácia como inseticida. A taxa de mortalidade das larvas foi dose-dependente onde 2% de OE apresentou uma taxa de mortalidade de 83% e na

concentração de 4%, 100% das larvas morreram.

Quando avaliado a atividade antimicrobiana de diversos OEs do gênero *Cymbopogon*, Piasecki et al. (2021) perceberam que os OEs cujo os componentes principais eram o geranial e o neral, apresentaram maior atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina. Os OEs de *C. flexuosus* e *C. schoenanthus* foram os que apresentaram as maiores concentrações de geranial e neral.

C. schoenanthus já foi verificada também contra os estágios de desenvolvimento dos tricostrongilídeos (nematoda). O principal componente do OE de *C. schoenanthus* foi o geraniol (62,5%) e este foi o que melhor apresentou ação contra os tricostrongilídeos, em comparação com o OE de *Cymbopogon martinii* e *Mentha piperita* (Katiki et al., 2011). Apesar da pouca disponibilidade de estudos avaliando a atividade antimicrobiana da espécie de *C. schoenanthus*, a sua efetividade já foi descrita na literatura contra alguns microrganismos: No estudo de Hashim et al. (2017) a atividade antimicrobiana de *C. schoenanthus* contra *Escherichia coli*, *S. aureus* e *Klebsiella pneumoniae* foi verificada e evidenciada até mesmo sobre cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina.

De acordo com os estudos demonstrados na literatura, faltam pesquisas que avaliem a ação combinada dos OEs de *C. schoenanthus* e *P. graveolens* sobre microrganismos de interesse odontológico.

2.3 *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus aureus* e *Candida* spp.

S. mutans é uma bactéria acidofílica e acidogênica, produtora de polissacarídeos extracelulares e de biofilme. É considerado um dos principais microrganismos patogênicos da cárie dental (Li et al., 2020). O biofilme formado na superfície dental é um fator de virulência essencial para esta espécie provocar a doença. Pensando nisso, Spengler et al. (2017) estudaram a adesão de *S. mutans* em comparação com *Staphylococcus carnosus*, sobre a hidroxiapatita. A força de adesão foi medida por espectroscopia. Os resultados mostraram que *S. mutans* possui uma capacidade de adesão sobre a superfície de hidroxiapatita muito maior do que *S.*

carosus. Além disso, foi demonstrado que a presença da saliva aumenta, de forma significativa, esta força de adesão sendo um importante fator para a formação de biofilme.

Considerando a patogenicidade do *S. mutans* como o principal agente etiológico da cárie, Matsumoto-Nakano et al. (2011) avaliaram a atividade cariostática do extrato de prímula (*Oenothera biennis*). A adesão de células de *S. mutans* através de mecanismos sacarose-dependente foi reduzida em 73% quando tratado com o extrato na concentração de 100 mg/mL. A síntese de glucanos insolúveis também foi reduzida com o tratamento. Já no experimento realizado em ratos, estes foram expostos a uma concentração de 0,05 mg/mL de extrato diluído em água, durante 73 dias. Os ratos que foram servidos com a água tratada apresentaram uma redução significativa nas lesões de cárie, quando comparada ao grupo controle.

Pieri et al. (2012) descobriram a ação inibitória do óleo de copaíba (*Copaifera officinalis*) contra *S. mutans*. Neste estudo o óleo de copaíba mostrou ter ação bacteriostática, mas não ter ação bactericida já que não apresentou valores de CMM. Assim os autores concluem que o óleo de copaíba apresenta uma atividade bacteriostática, mas não bactericida contra *S. mutans*.

O extrato de *Melia azedarach* (cedro-do-ceilão) demonstrou ação antibacteriana contra *S. mutans* no estudo de Bona e Nedel (2015). O método escolhido para avaliar a efetividade do extrato foi o método disco-difusão. Os discos foram impregnados com concentração de 0,1 g/mL de extrato. A efetividade de moléculas isoladas da planta também foi avaliada. Nenhuma das partes isoladas apresentaram resultados comparáveis com o controle (clorexidina 0,12%). Já o extrato apresentou ótimo efeito bactericida contra *S. mutans*, demonstrando uma zona de inibição similar ao controle.

Em um estudo com fitoterapia, Philip et al. (2019) testaram extratos das frutas de morango, mirtilo e airela, de forma isolada e combinada, sobre biofilme de *S. mutans*. Com isto, o biofilme tratado passou pelo processo de análise da atividade metabólica, acidogenicidade, viabilidade celular, biovolume e organização estrutural. Enquanto o extrato de morango não apresentou efeitos significantes sobre o biofilme, os extratos de airela e o extrato combinado das três frutas mostraram reduções significativas na atividade metabólica, produção de ácidos e biovolume. A organização estrutural também se mostrou menos compacta em comparação com o grupo

controle. Assim, os autores concluíram que o extrato de airela, dentre os extratos testados, foi o que se apresentou mais promissor para modulação da formação de biofilme.

Já Li et al. (2020) avaliaram a ação de um composto isolado de plantas, o resveratrol, sobre *S. mutans*. O fitocomposto mostrou valor de CIM de 800 µg/mL e, nos valores sub-CIM, o resveratrol foi capaz de diminuir a produção de ácidos, produção de polissacarídeos e a formação de biofilme. A expressão gênica relacionada aos fatores de virulência da bactéria também foi reduzida.

Abdel-Aziz et al. (2020) exploraram a atividade de ácidos graxos produzidos por cepas fúngicas de *Arthrographis kalrae* contra *S. mutans*. Surpreendentemente, os ácidos produzidos inibiram completamente o biofilme e a produção de polissacarídeo extracelular insolúvel. Ainda, estes não apresentaram ação bactericida contra o microrganismo e nem citotoxicidade à célula de fibroblasto humano.

Outro microrganismo de interesse é *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* é uma importante bactéria, capaz de provocar sérias doenças nos seres humanos, como endocardite, pneumonia e bacteremia. O tratamento desta infecção é um desafio, visto que a erradicação deste microrganismo é complicada. Isto porque tem surgido cada vez mais, cepas resistentes aos antibióticos atuais (Chang et al., 2020). *S. aureus* coletado durante dois anos, de amostras de sangue de pacientes internados em um hospital localizado na Índia, foram submetidas à uma análise do perfil de resistência aos antimicrobianos. Destes, 60% se mostraram resistentes à oxacilina e à cefoxitina. E dois isolados apresentaram alta resistência à vancomicina e à linezolida. O estudo destaca a manifestação de *S. aureus* resistentes e as ameaças que este pode ocasionar para a saúde dos infectados. Sendo necessário a descoberta de novos agentes antimicrobianos eficazes contra esta espécie (Kumar, 2016).

Em um estudo mais recente, 146 cepas de *S. aureus* foram isolados de hospitais entre 2017 e 2018. A fim de identificar a presença de cepas resistentes à metilina, os autores recorreram à utilização do teste de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). 16,4% dos isolados clínicos apresentaram resistência à metilina. Dentre estes, 11 genótipos diferentes de resistência foram encontrados, um resultado bastante preocupante (Firoozeh et al., 2020).

Analisando o impacto da falta de higiene oral adequada em indivíduos acima de 60 anos, Khadka et al. (2021) concluíram que os microrganismos presentes na

cavidade oral como, *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *C. albicans*, estão fortemente associados à pneumonia por aspiração, com altas taxas de mortalidade.

Levando em conta esta problemática, a atividade antimicrobiana de 42 extratos de plantas foram analisadas contra *S. aureus*. Para isto, foram selecionadas cepas padrão ATCC de *S. aureus*, *S. aureus* resistente à penicilina e *S. aureus* multirresistente. treze extratos apresentaram ação antibacteriana contra todas as cepas testadas. Dentre eles, 4 extratos foram classificados como altamente eficazes, foram eles: larrea, uva-de-urso, eucalipto e erva de São-João. Os resultados mostraram a possibilidade da utilização de recursos naturais contra esta importante espécie (Gerstel et al., 2018).

Um gel de extrato de *Sebastiania hispida* foi explorado em um modelo animal com lesões infectadas por *S. aureus*. O período de tratamento foi de 3 e 21 dias, utilizando concentrações de gel em 0,2 e 2%. Na análise histológica verificou-se que a regressão das lesões foi similar em ambas as concentrações. E mais, o gel de *S. hispida* promoveu uma grande produção de fibras colágenas. Por tanto o gel se mostrou promissor no tratamento complementar às lesões com infecções por *S. aureus* (Muller et al., 2018).

A candidíase apresenta uma alta taxa de mortalidade, entre 40 a 55% quando acomete os pacientes em cuidados intensivos (Logan et al., 2020). Infecções invasivas causadas por *Candida* spp. têm sido descritas no mundo todo. Para avaliar a epidemiologia desta doença, foram coletados artigos científicos publicados durante 10 anos. cepas multirresistentes de *Candida albicans* foram identificadas em 15 países. *C. glabrata* foi a segunda espécie com maior índice de resistência antifúngica. *C. krusei* junto com algumas outras cepas de *Candida* também foram consideradas como potenciais cepas multirresistentes (Colombo et al., 2017).

Para a manifestação clínica da candidíase é necessária a formação de biofilme, ou seja, uma comunidade de fungos do gênero *Candida*, aderidos a uma matriz extracelular (Kernien et al., 2018). Dentre o gênero, *C. albicans* é a mais prevalente nos seres humanos e conseqüentemente, também é o mais prevalente nos casos de candidíase, com alta taxa de mortalidade em condições mais invasivas. A dificuldade no tratamento da infecção se dá por conta de os agentes antifúngicos atuais apresentarem um alto custo e alta toxicidade. Além da problemática da resistência antifúngica que essa espécie tem desenvolvido (Chen et al., 2020; Li et al., 2018;

Lohse et al., 2018). No entanto, as espécies não-albicans também chamam a atenção da comunidade médica e científica, pois estas têm sido relacionadas a casos de disseminação (Barac et al., 2020).

Lyu et al. (2016) avaliaram protocolos para tratamento com o antifúngico nistatina contra a candidíase oral. Os resultados demonstraram que a utilização da nistatina em suspensão oral não seria a melhor abordagem para o tratamento. Mas, a combinação da prescrição da nistatina em suspensão oral suplementada com a prescrição do antifúngico em formato de pastilha, obtiveram uma maior taxa de remissão da infecção. Também foi demonstrado que os tratamentos prolongados (acima de 4 semanas) e com doses mais altas, estão mais relacionados ao sucesso do tratamento.

Na cavidade oral, a candidíase está associada, entre vários fatores, à higiene bucal deficiente, pensando nisso a efetividade da *Aloe vera* foi avaliada em um estudo clínico duplo-cego randomizado em pacientes adolescentes com deficiência intelectual, que são indivíduos que costumam apresentar uma certa dificuldade para manter uma boa higiene bucal. O cuidador responsável foi orientado a escovar os dentes do paciente duas vezes ao dia com um dentifrício contendo *Aloe vera* e foi comparada ao grupo que recebeu o dentifrício contendo triclosan. Ao final de 30 dias de uso, o dentifrício contendo *Aloe vera* foi capaz de reduzir o número de cepas de *Candida* spp. na cavidade oral sem apresentar nenhum efeito colateral (Khatri et al., 2017).

Outra planta que já demonstrou atividade antifúngica contra *Candida* spp. é *Ageratina pichinchensis*. O extrato já foi testado como uso tópico no tratamento da dermatomicose. Romero-Cerecero et al. (2017) escolheram este extrato para avaliar sua aplicação para o tratamento de candidíase vaginal. Após os 6 dias de tratamento, 100% dos pacientes tratados com *A. pichinchensis* relataram melhora ou ausência total dos sintomas e, 2 semanas após a conclusão do tratamento foi realizada uma nova coleta de dados onde 81,2% dos pacientes apresentaram êxito no tratamento.

Cunha et al. (2020) avaliaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) sobre biofilmes monotípicos de *C. albicans* e *S. aureus*. O óleo essencial foi colocado em contato por 1 minuto sobre o biofilme, nas concentrações de 5x e 10x os valores da CMM. O óleo essencial foi comparado com outras duas soluções de clorexidina 0,12%, uma com e outra sem álcool em sua

composição. Ao final, as 3 soluções estudadas apresentaram uma ótima inibição na formação de biofilme, mas, o óleo essencial de citronela apresentou uma redução maior do que a solução de clorexidina. Ainda, comparando a toxicidade das três soluções sobre células de queratinócitos humanos (HaCat), o óleo essencial foi o que apresentou a menor toxicidade.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste estudo é avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana e antibiofilme dos óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* (gerânio) e *Cymbopogon schoenanthus* (lemongrass) e o sinergismo entre eles, sobre cultura planctônica e biofilmes monotípicos de *Candida albicans*, *Candida dubliniensis*, *Candida krusei*, *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos óleos essenciais e microrganismos

Os óleos essenciais de *Pelargonium graveolens* (gerânio) e *Cymbopogon schoenanthus* (*lemongrass*) foram obtidos da empresa WNF óleos essenciais (São Paulo, SP) com seus devidos perfis analíticos (Anexos A e B).

Todas as cepas foram provenientes do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual Paulista - Unesp (São José dos Campos, SP).

4.2 Microrganismos e condições de cultivo

Os ensaios foram realizados utilizando cepa de referência ATCC (*The American Type Culture Collection*) de *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (ATCC MYA 646), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Streptococcus mutans* (ATCC 35688) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538). Alíquotas das amostras bacterianas e fúngicas congeladas foram reativadas em meios de cultura, sendo ágar MS (*Mitis Salivarius*) para crescimento de *S. mutans*, ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) para crescimento de *Staphylococcus aureus* e ágar SD (*Sabouraud Dextrose*) para de espécies de *Candida*. As placas foram incubadas em estufa por 48h à 37°C (TE-371, Tecnal, Piracicaba, SP) e, *S. mutans* foi incubado em ambiente microaerofílico (Tsuji et al., 2020) sobre as mesmas condições de temperatura e tempo de incubação que as demais cepas.

4.3 Análise da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana dos OEs isolados e das associações foram avaliadas sobre todas as cepas-padrão ATCC: *Candida albicans* (ATCC 18804), *Candida dubliniensis* (ATCC MYA 646), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Streptococcus mutans* (ATCC 35688) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

4.3.1 Determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos óleos essenciais isolados

Para a determinação da Concentração Microbicida Mínima (CMM) dos óleos (isolados) para cada cepa microbiana, foi empregado o método de microdiluição em caldo, segundo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), norma M27-A2 (*Candida* spp.) e M7-A6 (*S. mutans* e *S. aureus*). Para a diluição do óleo essencial foi utilizado o *Tween 20* (LGC Biotecnologia, Cotia, SP, Brasil) na concentração de 0,5%, de acordo com Tran et al. (2020). Esta concentração foi alcançada através da diluição em meio de cultura caldo *Mueller Hinton* (MH) (Himedia®, Mumbai, Índia) ou RPMI 1640 (INLAB, Diadema, SP, Brazil). Com o *Tween 20* preparado, diluiu-se o óleo essencial neste, para obtenção da concentração desejada. O teste foi realizado em microplacas de 96 poços, onde adicionou-se 100 µL de meio de cultura (MH para *S. mutans* e *S. aureus* e RPMI 1640 para *Candida* spp.), em todos os poços exceto no primeiro poço de onde se seguiu a diluição seriada. Neste primeiro poço, adicionou-se 200 µL de óleo essencial, de onde partiram uma série de 10 diluições seriadas. Alíquotas de 100 µL de cada suspensão microbiana, padronizada em 10⁶ células/mL, foi adicionada em todos os poços, exceto nos controles de esterilidade e as placas foram para incubação por 48 h a 37°C, sendo que *S. mutans* foi colocado sobre as mesmas condições de incubação, mas em ambiente microaerofílico com 5% CO₂ (Tsuji et al., 2020). Como controle de esterilidade foi utilizado o meio de cultura (MH ou RPMI 1640) e meio de cultura com *Tween 20* a 0,5%. Já para o controle negativo,

adicionou-se 100 µL de meio de cultura mais 100 µL de microrganismo e o mesmo foi feito com o meio de cultura com *Tween* 20 a 0,5%. As concentrações finais dos OE obtidas na placa variaram entre 16 a 0,03% (Quadro 1).

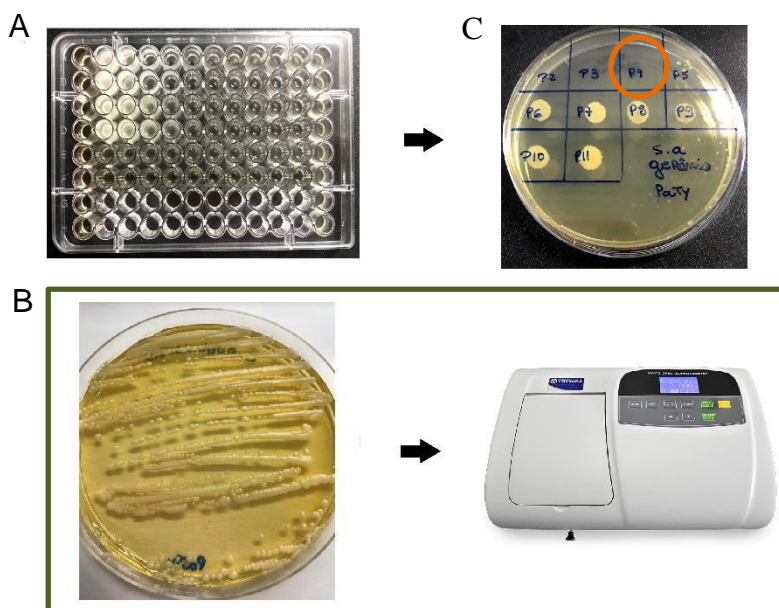
Em seguida, foram semeados 5 µL em ágar SD (*Sabouraud Dextrose*) (Kasvi, Itália) para as cepas de *Candida*, e em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) (Kasvi, Itália) para *S. mutans* e *S. aureus*. Após 48h 37°C de incubação, a CMM de cada óleo para cada cepa foi determinada onde não se observou crescimento de colônias. Todos os testes foram realizados em duplicatas e foram repetidos duas vezes em momentos distintos (Figura 1).

Quadro 1 – Diluições dos óleos essenciais para determinação da CMM

OE	Concentração por poço									
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
GE	16%	8%	4%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%
LE	16%	8%	4%	2%	1%	0,5%	0,25%	0,12%	0,06%	0,03%

Legenda: OE: óleo essencial. GE: gerânio. Le: *lemongrass*. 2 ao 11: número dos poços.
Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 1 – Metodologia para determinação da Concentração Microbicida Mínima



Legenda: A: Óleos essenciais diluídos em placa de 96 poços contendo meio de cultura. B: Microrganismo semeado em ágar para padronização em espectrofotômetro em 10^6 células/mL. C: Resultado da concentração microbicida mínima após incubação por 24 h a 37°C . Círculo laranja: indicação da concentração microbicida mínima determinada.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3.2 Método de Microdiluição *Checkerboard* das associações dos óleos essenciais

O efeito combinado dos óleos foi avaliado pela técnica *checkerboard* (tabuleiro de xadrez), de acordo com Fratini et al. (2017), Odds (2003), Ušjak et al. (2019). A técnica é baseada no teste de sensibilidade por microdiluição em caldo, e determina o tipo de interação entre os óleos em: sinérgicas, aditivas, indiferente ou antagônicas. Foi utilizado como meio de cultura caldo MH (para *S. mutans* e *S. aureus*) e RPMI 1640 (para *Candida* spp.).

Para a combinação dos OE, foram utilizados como referência os valores de CMM previamente obtidos. Assim, foi preparada a solução mãe do OE1 (gerânio), na concentração 4 vezes maior que o valor do CMM. A partir desta solução, seguiu-se a diluição seriada pela placa. Já o OE2 (*lemongrass*) foi diluído fora da placa, em microtubos do tipo Eppendorf, partindo-se também, da solução mãe (4x maior do que

o CMM), para a diluição seriada nos outros microtubos. Sendo assim, 100 µL do óleo 1 (gerânio) foram adicionados na fileira “a” do poço 2 ao 10 e a partir destes poços, 50 µL do óleo foi diluído seriadamente nos poços abaixo, deste modo, a concentração do OE1 caiu no sentido vertical da microplaca. Logo em seguida, 50 µL do óleo 2 (*lemongrass*) foram adicionados nos poços de modo que a concentração deste caísse no sentido horizontal da microplaca, de modo a obter concentrações finais: CMM, CMM/2, CMM/4, CMM/8, CMM/16, CMM/32 e CMM/64, de forma que fossem associadas diferentes concentrações dos dois óleos. Em seguida, foi adicionado 100 µL do inóculo microbiano, padronizado em 10⁶ células/mL), totalizando volume de 200 µL em cada poço. No controle negativo, adicionou-se meio de cultura, mais inóculo bacteriano e no controle de esterilidade foi acrescentado apenas meio de cultura. Este controle também foi feito com o meio de cultura com *Tween* 20 a 0,5%. As placas foram incubadas a 37°C por 48h, e no caso do *S mutans*, em microaerofilia (Ušjak et al., 2019). Para determinação da CMM, uma alíquota de cada poço foi colocada em ágar *Sabouraud Dextrose* (Kasvi, Itália) para as cepas de *Candida* spp., e em ágar BHI (*Brain Heart Infusion*) para *S. mutans* e *S. aureus*. As placas foram incubadas em estufa por 48 h a 37°C e foi determinada de acordo com a ausência de crescimento microbiano nas placas. Todos os testes foram realizados em duplicatas. Para avaliar o efeito sinérgico dos óleos, adotou-se o índice de concentração inibitória fracionária (ICFI), que classifica as combinações em sinérgicas, aditivas, indiferentes ou antagônicas. O ICFI é calculado através da soma da concentração inibitória fracionada (CIF) do óleo 1 mais a CIF do óleo 2.

A ICIF pode ser definida como:

$$\frac{\text{CMM combinada}}{\text{CMM óleo 1 isolado}} + \frac{\text{CMM combinada}}{\text{CMM óleo 2 isolado}}$$

Uma combinação foi considerada sinérgica a uma ICFI ≤0,5, aditiva quando ICFI é >0,5 e ≤1,0, indiferente quando ICFI > 1 e ≤ 4 e antagonista em ICFI > 4,0. A mesma fórmula foi utilizada para calcular o índice de concentração fungicida fracionária (ICFF), usando também os valores de CMM (Odds, 2003).

Quadro 2- Esquema representativo da combinação do óleo essencial de gerânio e *lemongrass* e suas concentrações aplicadas em contato com *Staphylococcus aureus* na placa de 96 poços, simulando a técnica do tabuleiro de xadrez

	2	3	4	5	6	7	8	9	10
a	4 4	4 2	4 1	4 0,5	4 0,25	4 0,12	4 0,06	4 0,03	4 0,01
b	2 4	2 2	2 1	2 0,5	2 0,25	2 0,12	2 0,06	2 0,03	2 0,01
c	1 4	1 2	1 1	1 0,5	1 0,25	1 0,12	1 0,06	1 0,03	1 0,01
d	0,5 4	0,5 2	0,5 1	0,5 0,5	0,5 0,25	0,5 0,12	0,5 0,06	0,5 0,03	0,5 0,01
e	0,25 4	0,25 2	0,25 1	0,25 0,5	0,25 0,25	0,25 0,12	0,25 0,06	0,25 0,03	0,25 0,01
f	0,12 4	0,12 2	0,12 1	0,12 0,5	0,12 0,25	0,12 0,12	0,12 0,06	0,12 0,03	0,12 0,01
g	0,06 4	0,06 2	0,06 1	0,06 0,5	0,06 0,25	0,06 0,12	0,06 0,06	0,06 0,03	0,06 0,01

Legenda: esquema das diluições combinadas dos óleos essenciais, no qual as concentrações de gerânio (em verde) diminuem no sentido vertical e as concentrações de *lemongrass* (em azul) caem no sentido horizontal da placa.

Fonte: Elaborado pelo autor.

4.4 Análise da atividade antibiofilme

As concentrações dos OEs para avaliar a atividade antimicrobiana sobre biofilmes foram baseados nos valores de CMM obtidos nos testes de microdiluição em caldo e na microdiluição *checkerboard*. Assim, ambos os OEs foram aplicados em concentrações de CMM, 2 X CMM e 4 X CMM para determinar seu efeito isolado e nas concentrações em que demonstraram efeitos sinérgicos e aditivos para determinar o seu efeito combinado sobre os biofilmes. Para a formação dos biofilmes foram adicionados em microplacas de 96 poços (Kasvi, China), 100 µL/poço de caldo

BHI (*Brain Heart Infusion*) e 100 µL/poço de suspensões microbianas padronizadas em espectrofotômetro (10^7 células/mL). Para isso, colônias das respectivas cepas foram diluídas em solução salina. Após, a placa foi incubada em estufa bacteriológica (37°C) por 48 h, com a substituição do meio de cultura em 24h, em seguida as placas foram encaminhadas para aplicação dos tratamentos.

4.4.1 Tratamento

Passado o período de formação de cada biofilme (5 cepas), estes foram colocados em contato com os OEs separadamente, em 3 concentrações microbicidas pré-determinadas, CMM e 2x e 4x superiores, pelo período de 5 min e 24h, totalizando 30 grupos. Como controle de esterilidade e controle negativo foram utilizados o próprio meio de cultura BHI e como controle positivo foi utilizado Gluconato de clorexidina 0,12% (Periotrat, Kley Hertz), para *S. mutans* e *S. aureus* e nistatina 100.000 UI/mL (Teuto) para *C. albicans*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*. Posteriormente à aplicação dos tratamentos os biofilmes foram lavados com solução salina estéril 0,9% e em seguida foram encaminhados para o teste de mensuração. A mensuração dos biofilmes foi realizada por meio do teste de MTT, evidenciando a atividade metabólica dos microrganismos.

4.4.2 Atividade metabólica dos microrganismos pelo teste de MTT

Após submetido aos respectivos tratamentos o biofilme foi preparado para o teste de MTT, para tanto, foram adicionados 100 µL/poço da solução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), composta por 0,5 miligramas diluído em 1 mL de caldo BHI, em seguida a placa foi incubada ao abrigo da luz por 1 hora em estufa a 37°C. Após o período de incubação a solução foi retirada e acrescentou-se 100 µL de Dimetilsulfóxido (DMSO). A placa foi novamente incubada em estufa a 37°C por 10 minutos e logo após, colocada em agitação constante por 10

minutos. A placa foi lida em leitora de microplaca em 570 nm, e as densidades ópticas foram convertidas, por meio da fórmula abaixo, em percentual de atividade metabólica das células do microrganismo:

% Atividade metabólica = 100 - (DO Grupo Tratado x 100) / (Média DO Grupo Controle)

4.5 Análise estatística

Os dados obtidos nos testes *in vitro* obtiveram distribuição normal e foram analisados estatisticamente pelo método ANOVA complementado pelo Teste de *Tukey* com nível de significância de 5% ($p \leq 0.05$).

5 RESULTADOS

5.1 Atividade antimicrobiana pelo teste de microdiluição em caldo

Ambos os óleos essenciais (gerânio e *lemongrass*) demonstraram ação antimicrobiana sobre todas as cepas testadas. Os valores de CMM estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 – Valores de Concentração Microbicida Mínima (%) do óleo essencial de *Pelargonium graveolens* (gerânio) e *Cymbopogon schoenanthus* (*lemongrass*) sobre *S. mutans*, *S. aureus*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*

	OE Lemongrass	OE Gerânio
Microrganismos	CMM	CMM
<i>S. mutans</i>	16%	16%
<i>S. aureus</i>	4%	4%
<i>C. albicans</i>	0,06%	0,06%
<i>C. krusei</i>	0,06%	0,03%
<i>C. dubliniensis</i>	0,03%	0,06%

Legenda: CMM: Concentração mínima microbicida. OE: óleo essencial.
Fonte: Elaborado pelo autor.

5.2 Atividade antimicrobiana do efeito combinado dos OEs

Os óleos essenciais apresentaram uma combinação sinérgica e três combinações aditivas para *S. aureus* (Tabela 2). Por outro lado, os OEs não apresentaram nenhum efeito sinérgico ou aditivo para *S. mutans*, *C. albicans*, *C. krusei* e *C. dubliniensis*.

Tabela 2 – Valores de Concentração Microbicida Mínima dos óleos essenciais isolados e combinações sinérgicas e aditivas dos óleos essenciais de gerânio e lemongrass sobre *Staphylococcus aureus*

Combinação	CMM isolado		Combinação		Valores ICIF	Redução da CMM		Interação
	LE	GE	LE	GE		LE	GE	
LE + GE	4%	4%	2%	0,5%	0,62	2 x	8 x	A
LE + GE	4%	4%	2%	0,25%	0,56	2 x	16 x	A
LE + GE	4%	4%	2%	0,12%	0,53	2 x	33 x	A
LE + GE	4%	4%	1%	0,06%	0,26	4 x	66 x	S

Legenda: LE: lemongrass; GE: gerânio; CMM: Concentração Microbicida Mínima; ICIF: índice de concentração inibitória fracionária; A: aditiva; S: sinérgica.
Fonte: Elaborado pelo autor.

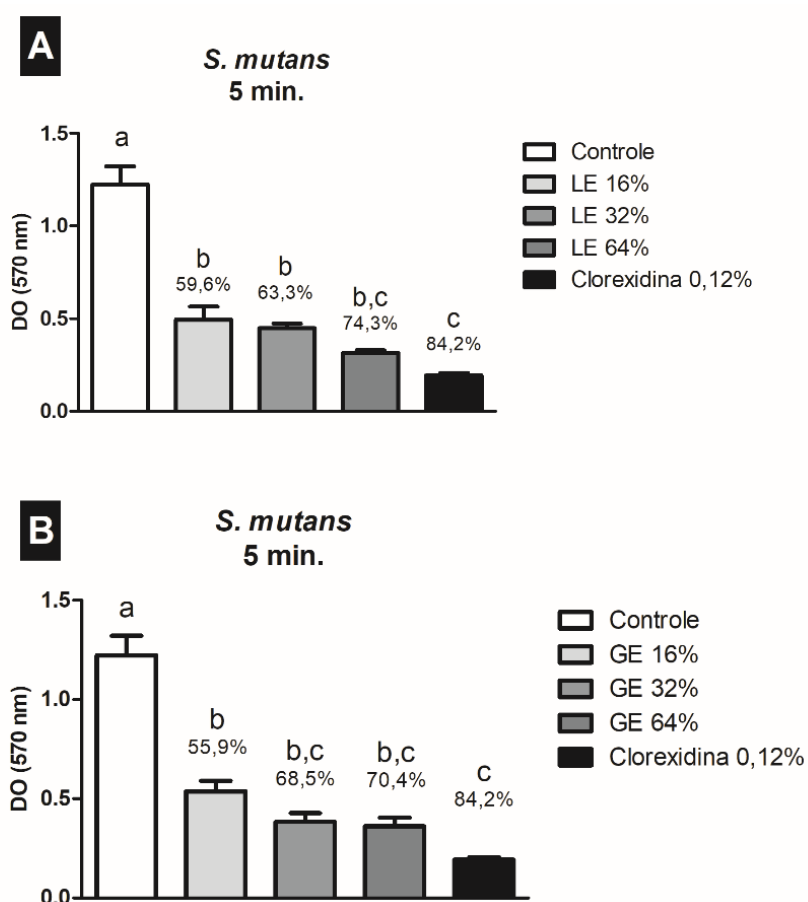
5.3 Atividade antibiofilme dos óleos essenciais

Para o tratamento do biofilme de *S. mutans*, *S. aureus* e *Candida* spp., foram usadas as concentrações 1x CMM, 2x CMM e 4x CMM dos óleos essenciais de gerânio e lemongrass de forma isoladas.

O tratamento do biofilme de *S. mutans* com o OE de lemongrass pelo tempo de 5 min. promoveu ação antimicrobiana nas concentrações de 16, 32 e 64%, com 59,6%, 63,3% e 74,3% de redução de biofilme, respectivamente. Já a aplicação do OE de

gerânio por 5 min. nas concentrações de 16, 32 e 64% promoveram redução do biofilme em 55,9%, 68,5% e 70,4%, respectivamente. Todas as concentrações de ambos os OEs apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle e ainda, as concentrações de 64% de gerânio e de 32 e 64% de lemongrass foram estatisticamente semelhantes à clorexidina. A clorexidina utilizada como controle reduziu 84,2% quando comparado com o controle negativo (figura 2).

Figura 2 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Streptococcus mutans* por 5 minutos



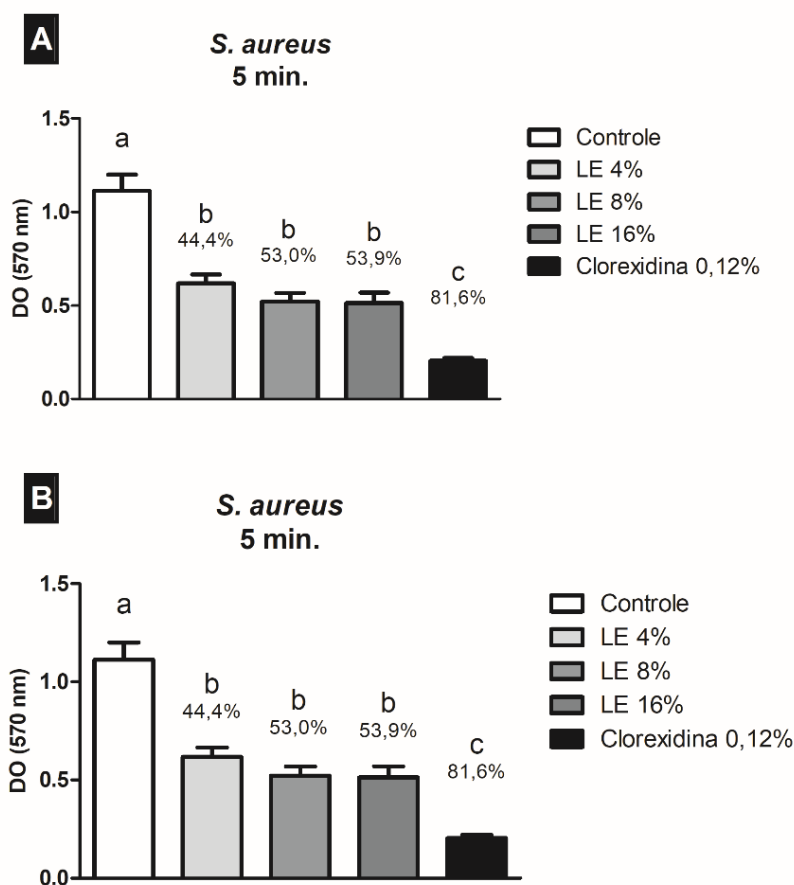
Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; P<0.0001.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O OE de *lemongrass* aplicado por 5 min. sobre o biofilme de *S. aureus* reduziu o biofilme em 44,4%, 53 e 53,9% nas concentrações de 4, 8 e 16%, respectivamente.

O OE de gerânio aplicado pelo tempo de 5 min. nas concentrações de 4, 8 e 16% promoveu a redução de 55,6%, 68,4% e 66,1%, respectivamente. Todas as concentrações de ambos os OEs apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle. A clorexidina reduziu 81,6% do biofilme, sendo que as concentrações de 8 e 16% de OE de gerânio foram estatisticamente semelhantes à clorexidina (figura 3).

Figura 3 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Staphylococcus aureus* por 5 minutos

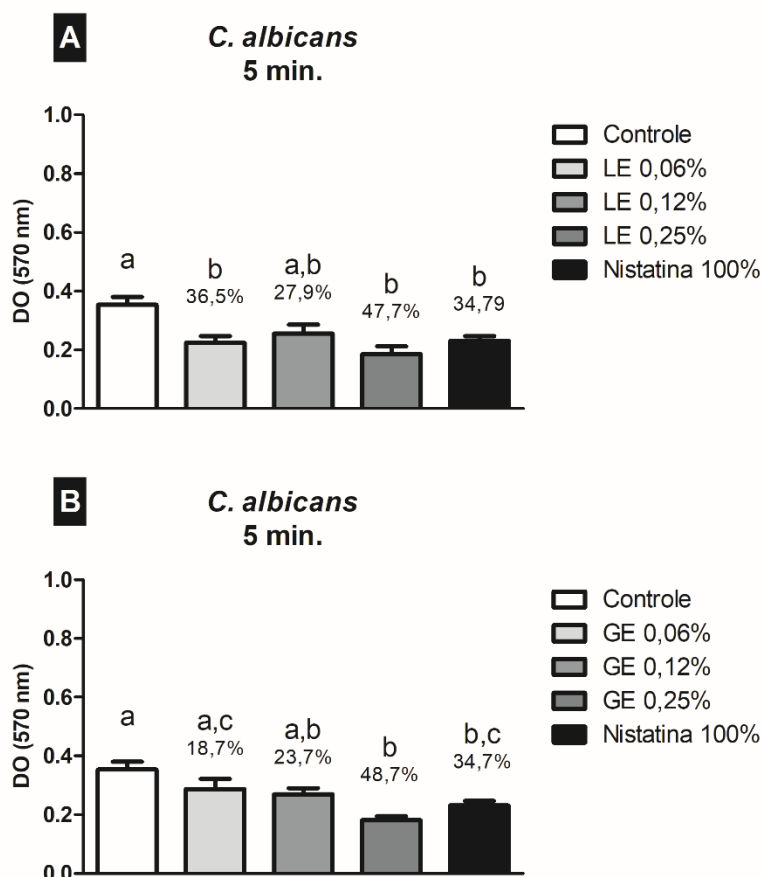


Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; P<0.0001.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Em relação às espécies de *Candida* os resultados da atividade antibiofilme de 5 min de contato seguem demonstrados nas figuras 4, 5 e 6.

Figura 4 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Candida albicans* por 5 minutos



Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.

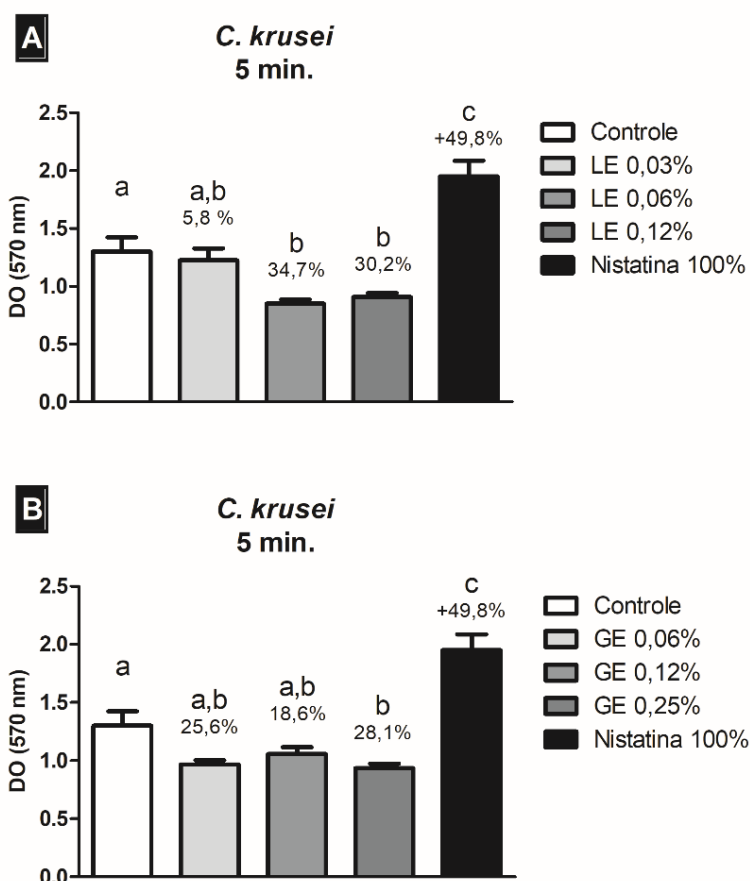
Fonte: Elaborado pelo autor.

O tratamento do biofilme de *C. albicans* com o OE de *lemongrass* pelo tempo de 5 min. promoveu ação antifúngica em todas as concentrações testadas, apresentando 36,5%, 27,9% e 47,7% de redução de biofilme, nas concentrações de 0,06%, 0,12 e 0,25% respectivamente. Já a aplicação do OE de gerânio por 5 min. nas mesmas concentrações promoveram redução do biofilme em 18,7%, 23,7% e 48,7%, respectivamente. As concentrações de 0,06 e 0,25% de *lemongrass* e de 0,25% de gerânio foram estatisticamente diferentes do grupo controle e semelhantes

à nistatina. A nistatina utilizada como comparação reduziu 34,7% do biofilme.

O OE de *lemongrass* aplicado por 5 min. sobre o biofilme de *C. krusei* reduziu o biofilme em 5,8%, 34,7% e 30,2% nas concentrações de 0,03%, 0,06% e 0,12%, respectivamente. O OE de gerânio aplicado pelo tempo de 5 min. nas concentrações de 0,06%, 0,12% e 0,25% promoveu a redução de 25,6%, 18,6% e 28,1%, respectivamente. As concentrações mais altas (0,06 e 0,12% de *lemongrass* e 0,25% de gerânio) de ambos os OEs foram estatisticamente diferentes do grupo controle. A nistatina não apresentou redução de biofilme para *C. krusei*.

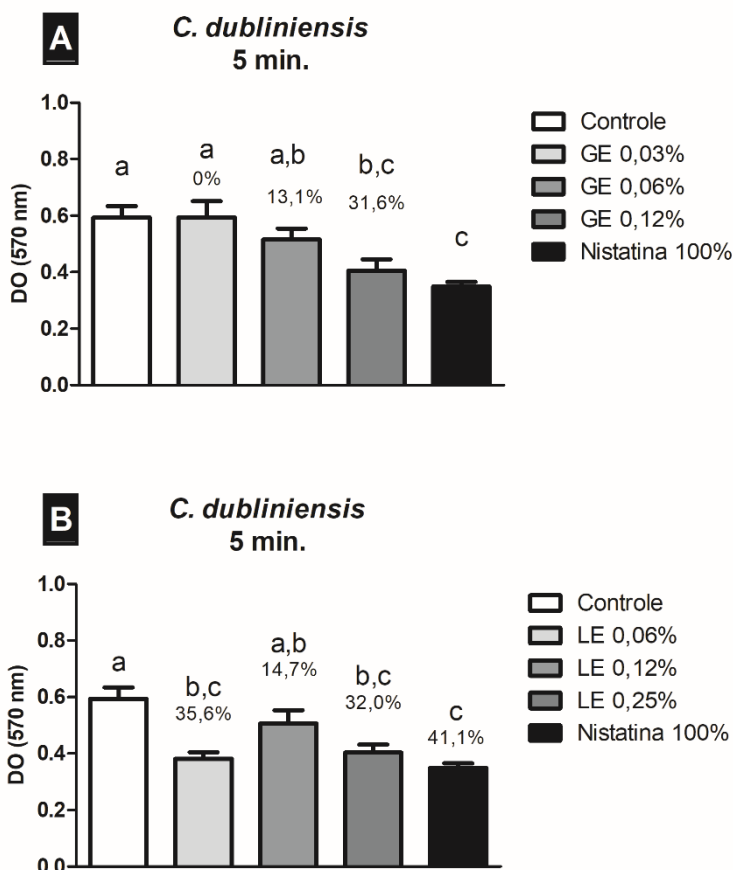
Figura 5 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Candida krusei* por 5 minutos



Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 6 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Candida dubliniensis* por 5 minutos



Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.

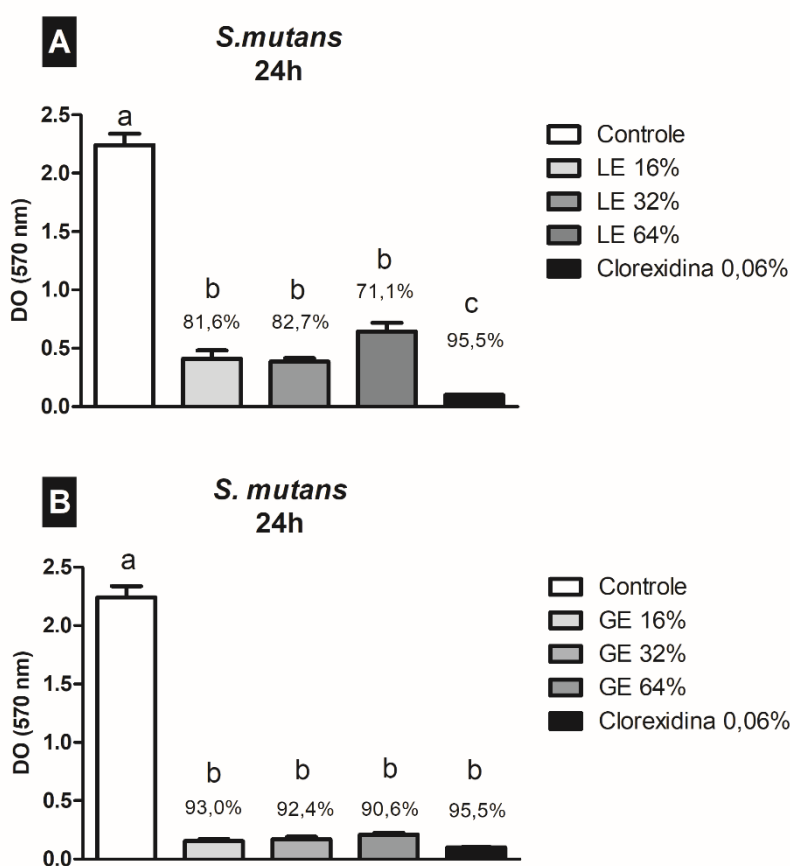
Fonte: Elaborado pelo autor.

Por fim, o biofilme de *C. dubliniensis* foi reduzido em 35,6% com 0,06% de óleo essencial de *lemongrass*, 14,7% com 0,12% de OE de *lemongrass* e reduziu 32% do biofilme com 0,25% de OE de *lemongrass*. O OE de gerânio na concentração de 0,03% foi o único que não apresentou nenhuma atividade antifúngica. Enquanto as concentrações de 0,06% e 0,12% reduziram 13,1% e 31,6% (respectivamente) do biofilme de *C. dubliniensis*. A nistatina reduziu 41,1% do biofilme. As reduções nas concentrações de 0,06 e 0,25% de *lemongrass* e de 0,12% de gerânio foram estatisticamente diferentes do grupo controle e semelhantes à nistatina.

Em relação ao tratamento dos biofilmes pelo tempo de 24 horas, para o biofilme de *S. mutans* com o OE de *lemongrass*, as concentrações de 16, 32 e 64% promoveu

ação antimicrobiana com 81,6%, 82,7% e 71,1% de redução de biofilme, respectivamente. Já a aplicação do OE de gerânio nas mesmas concentrações promoveram redução do biofilme em 93%, 92,4% e 90,6%, respectivamente, sendo que todas as concentrações foram estatisticamente semelhante à clorexidina, que por sua vez, reduziu o biofilme em 95,5% (figura 7).

Figura 7 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Streptococcus mutans* por 24 horas



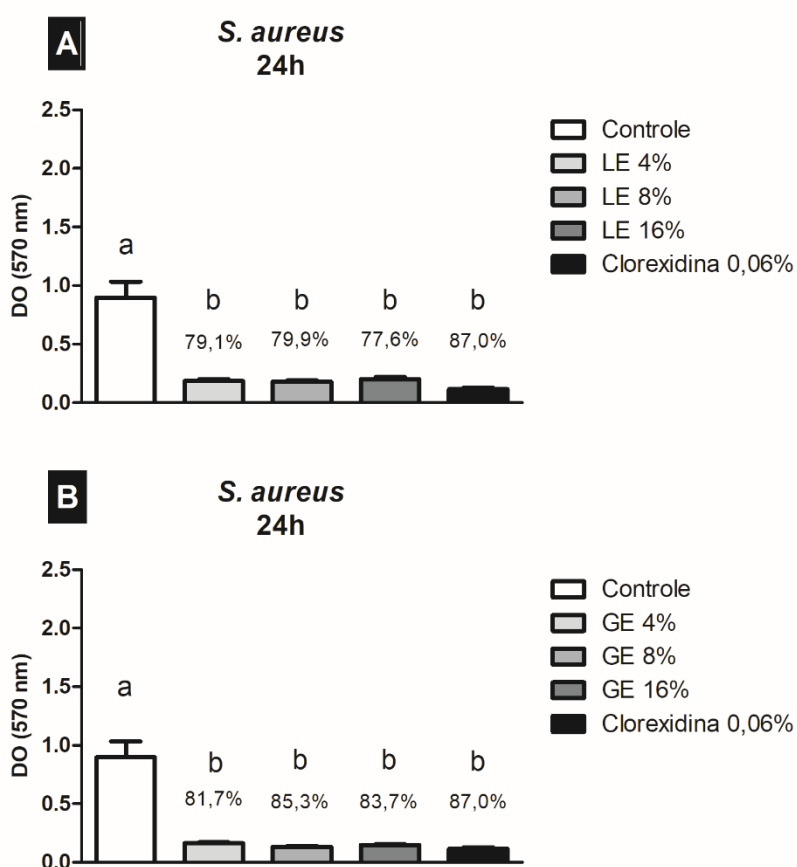
Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O OE de *lemongrass* aplicado por 24 h sobre o biofilme de *S. aureus* reduziu o biofilme em 79,1%, 79,9% e 77,6% nas concentrações de 4, 8 e 16%, respectivamente. Já o OE de gerânio aplicado pelo mesmo tempo, nas concentrações

de 4, 8 e 16% promoveu a redução de 81,7%, 85,3% e 83,7%, respectivamente. Todas as concentrações de ambos os OEs apresentaram diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo controle e estatisticamente semelhante à clorexidina que reduziu 87% (figura 8).

Figura 8 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Staphylococcus aureus* por 24 horas



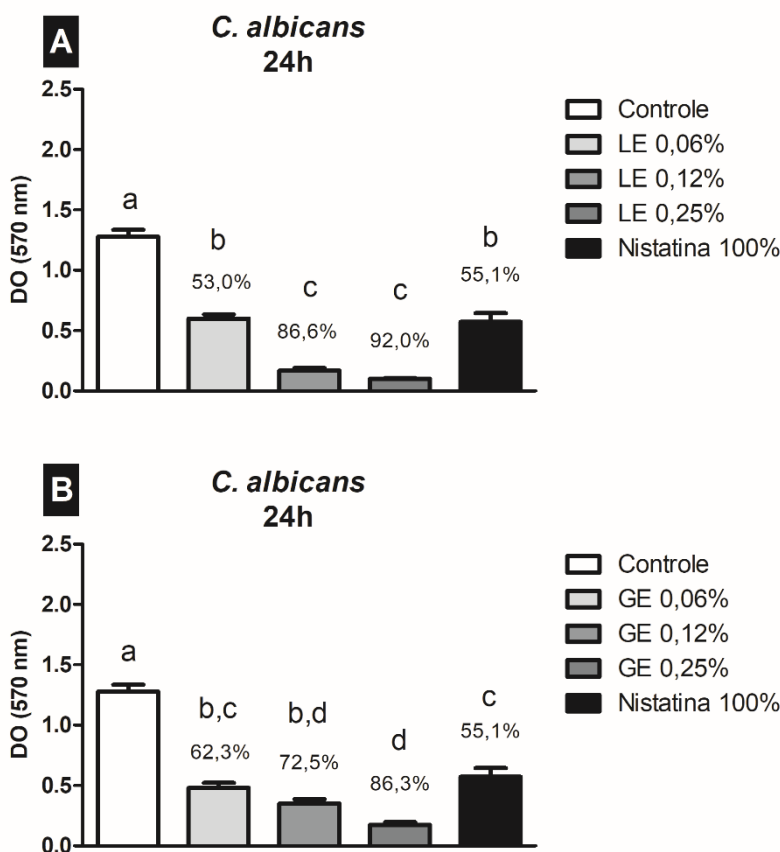
Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O tratamento do biofilme de *C. albicans* com o OE de *lemongrass* pelo tempo de 24 h promoveu ação antifúngica em todas as concentrações testadas, apresentando 53%, 86,6% e 92% de redução de biofilme, nas concentrações de 0,06%, 0,12 e 0,25% respectivamente. Já o tratamento com o OE de gerânio por 24

horas nas mesmas concentrações promoveram redução do biofilme em 62,3%, 72,5% e 86,3%, respectivamente. Todas as concentrações de ambos os OEs apresentaram diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle. A nistatina utilizada como comparação reduziu 55,1% do biofilme quando comparado com o grupo controle (figura 9).

Figura 9 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Candida albicans* por 24 horas



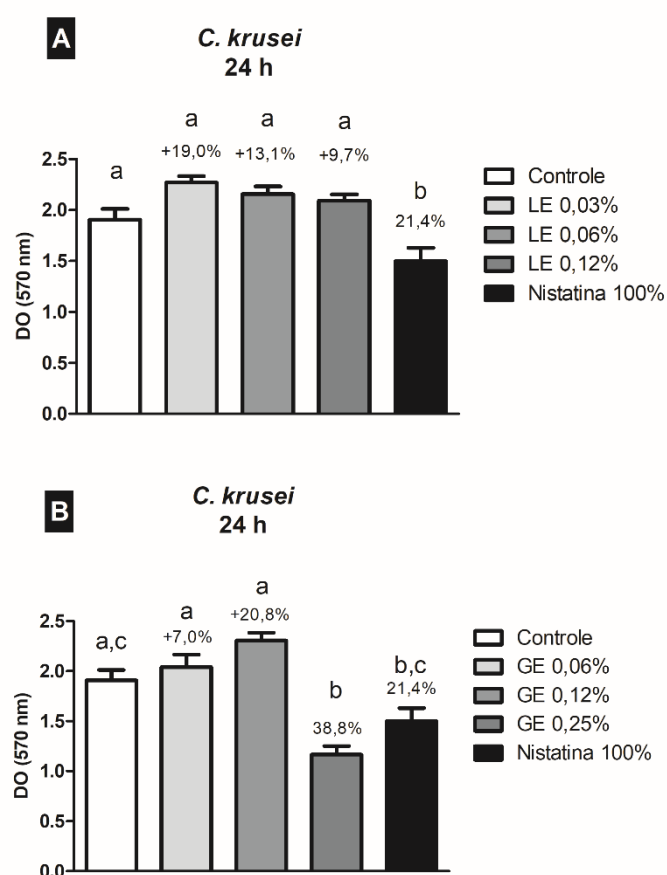
Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O OE de *lemongrass* aplicado por 24 h sobre o biofilme de *C. krusei* não apresentou atividade antifúngica nas concentrações de 0,03%, 0,06 e 0,12%, sendo todos estatisticamente semelhantes ao grupo controle. O OE de gerânio aplicado pelo

mesmo tempo, nas concentrações de 0,06 e 0,12% também não apresentaram atividade antifúngica. Por outro lado, a concentração de 0,25% promoveu redução de 38,8%, sendo estatisticamente diferente do grupo controle e semelhante à nistatina, que reduziu 21,4% (figura 10).

Figura 10 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Candida krusei* por 24 horas



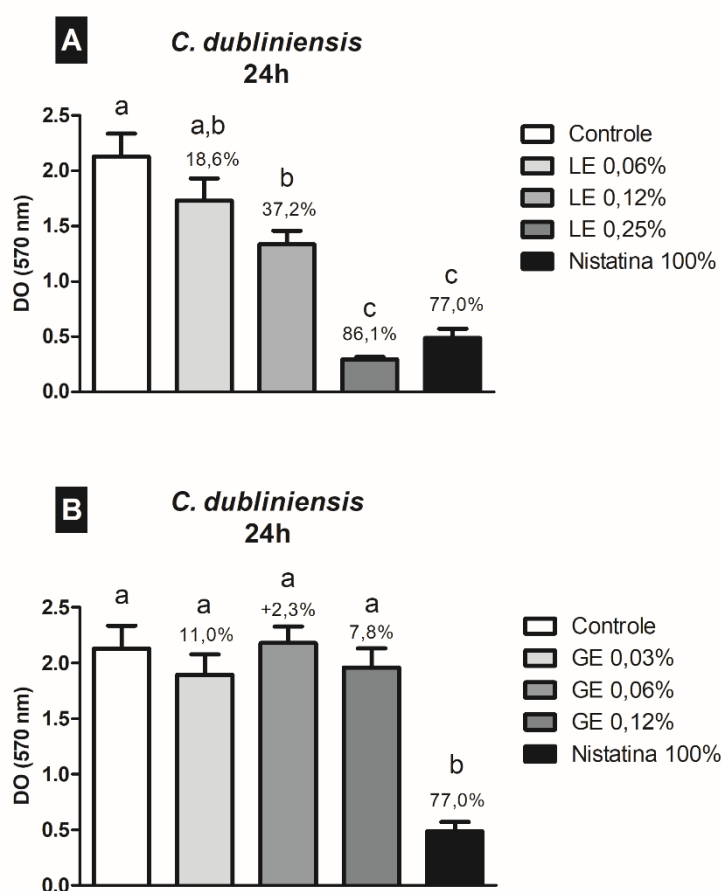
Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; P<0.0001.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Finalmente, o biofilme de *C. dubliniensis* tratado com OE de *lemongrass* foi reduzido 18,6% na concentração de 0,06%, 37,2% com 0,12% e reduziu 86,1% do biofilme com 0,25% de OE sendo que este último foi estatisticamente semelhante à nistatina e diferente do grupo controle. O OE de gerânio não apresentou atividade

antifúngica em nenhuma das concentrações testadas. O tratamento com a nistatina reduziu 77% do biofilme (figura 11).

Figura 11 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* sobre *Candida dubliniensis* por 24 horas

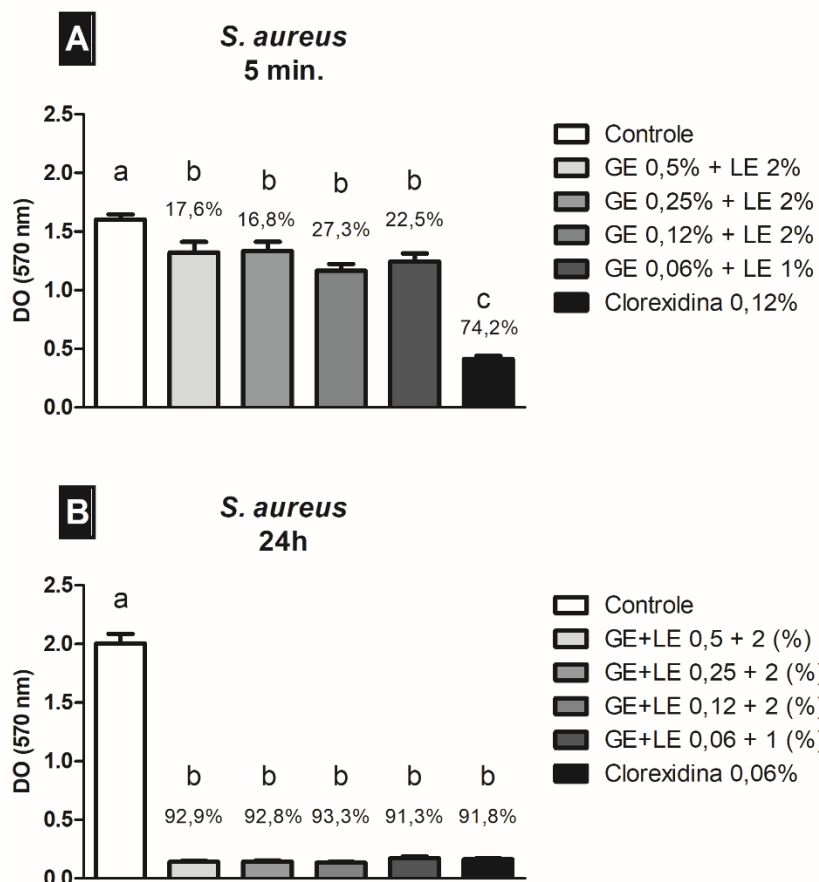


Legenda: A: *lemongrass*; B: gerânio; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.

Fonte: Elaborado pelo autor.

As combinações dos OEs também foram avaliadas sobre o biofilme de *S. aureus*, visto que foram alcançados efeitos sinérgico e aditivos quando colocados em contato com a espécie na sua forma planctônica. Desta forma, as concentrações (sinérgicas e aditivas) obtidas foram utilizados para avaliar sua ação sobre o biofilme (figura 12).

Figura 12 - Atividade antibiofilme dos óleos essenciais de gerânio e *lemongrass* de forma combinada sobre *Staphylococcus aureus* por 5 minutos e 24 horas



Legenda: A:5 min de tratamento; B: 24 h de tratamento; DO: densidade óptica; LE: óleo essencial de *lemongrass*; GE: óleo essencial de gerânio; $P < 0.0001$.
Fonte: Elaborado pelo autor.

O tratamento realizados com as concentrações aditivas pelo tempo de 5 min com 0,5% de OE de gerânio + 2% de OE de *lemongrass*, 0,25% de gerânio + 2% de *lemongrass* e 0,12% de gerânio + 2% de *lemongrass* reduziram 17,6%, 16,8% e 27,3%, respectivamente. Já a combinação sinérgica de 0,06% de OE de gerânio + 1% de *lemongrass* reduziu 22,5% do biofilme de *S. aureus*. Não houve diferença estatisticamente significante entre as concentrações aditivas e sinérgicas e todas as combinações apresentaram diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo controle. A clorexidina reduziu 91,8% do biofilme.

O tratamento realizados com as concentrações aditivas de 0,5% de OE de gerânio e 2% de OE de *lemongrass*, 0,25% de gerânio e 2% de *lemongrass* e 0,12%

de gerânio e 2% de *lemongrass* reduziram 92,9%, 92,8% e 93,3%, respectivamente, no tratamento de 24h. Por fim, a combinação sinérgica de 0,06% de OE de gerânio e 1% de *lemongrass* quando comparado com o controle, reduziu 91,3%. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as concentrações aditivas e sinérgicas e todas as combinações apresentaram diferenças estatisticamente significante em relação ao grupo controle e estatisticamente semelhante à clorexidina que reduziu 91,8% do biofilme.

6 DISCUSSÃO

Estima-se que até 2050 a taxa de mortalidade alcançará cerca de 10 milhões de mortes por ano devido aos impactos causados pela resistência antimicrobiana (Garau, Bassetti, 2018). Com esta crescente resistência antimicrobiana, estudos com plantas e seus derivados para tratamentos de infecções têm ganhado espaço. É possível encontrar na literatura estudos que comprovaram, assim como o presente estudo, a eficácia dos produtos fitoterápicos contra patógenos bacterianos e fúngicos (Antonioli et al., 2020; Kozics et al., 2019; Meccatti et al., 2021; de Oliveira et al., 2017).

No presente estudo foi possível verificar que os óleos essenciais de gerânio (*Pelargonium graveolens*) e lemongrass (*Cymbopogon schoenanthus*) possuem atividades antifúngicas e antimicrobianas contra as espécies estudadas. Entretanto, a sensibilidade aos OEs foi diferente entre as cepas fúngicas e bacterianas, nas quais as cepas de *Candida* se mostraram mais sensíveis na cultura planctônica, com valores de CMM variando entre 0,03% e 0,06% para ambos os óleos. Os OEs de gerânio e lemongrass também se mostraram eficazes contra as cepas de *S. mutans* e *S. aureus*, porém, em concentrações maiores, pois os valores de CMM variaram entre 4% e 16%. Quando os OEs foram combinados entre si, resultou em 1 concentração sinérgica e 2 aditivas contra *S. aureus*. Os resultados obtidos sugerem que os OEs de gerânio da espécie de *P. graveolens* e de lemongrass da espécie de *C. schoenanthus* podem se tornar uma alternativa viável para tratamento de doenças infecciosas. Contudo, ainda se faz necessário novos estudos avaliando as características farmacológicas e toxicológicas para o seu uso seguro.

De acordo com as informações disponibilizadas pelo fabricante os principais componentes do OE de gerânio são: geraniol (30,5%), citronelol (14,21%) e linalol (10,09%). Já o OE de lemongrass apresentou como principais constituintes o nerol (56,20%), acetato de nerol (13,36%) e geraniol (10,42%). O geraniol é um monoterpene encontrado em diversos OEs que possui uma variedade de atividades biológicas, como a atividade anti-inflamatória, anti-câncer e antimicrobiana (Maczka et al., 2020). O nerol também é um monoterpene, com atividades antioxidantes (Galappathie et al., 2017), hepatoprotetor (Islam et al., 2021) e sua atividade antifúngica foi comprovada sobre cepas de *C. albicans*. Citral é uma molécula

isométrica que consiste na mistura de gerânio e neral e sua atividade antimicrobiana já foi comprovada contra uma variedade de patógenos (Qian et al., 2020). Diante destes achados pressupõe-se que as atividades antimicrobianas demonstradas no presente estudo podem ter sido em razão da presença desses constituintes químicos nos OEs de gerânio e *lemongrass*.

Um estudo realizado por Gucwa et al. (2018) verificou a atividade antifúngica de diferentes OEs, incluindo o de *P. graveolens* que ficou entre um dos mais efetivos (dentre os 37 OEs testados) contra cepas clínicas de *C. albicans*. O óleo de gerânio apresentou valores de CMM entre 0,048 à 23,92 mg/mL. Neste caso, os autores optaram por utilizar, para diluição do óleo essencial, 2,5% de DMSO (Dimetilsulfóxido) enquanto no nosso estudo foi utilizado o *Tween 20* (0,5%). Existem diferentes tipos de soluções que podem ser utilizadas para facilitar a diluição dos OEs, como o *Tween 20* e 80, que são um tipo de detergente e os solventes, como o DMSO e o etanol (Castro et al., 1995). Mesmo com esta diferença na escolha do diluente, os resultados do presente estudo concordam com os resultados de Gucwa et al. (2018).

Szweda et al. (2015) avaliaram a ação antifúngica de alguns óleos essenciais (entre eles o OE de gerânio), própolis, nanopartículas de prata e extratos etanólicos sobre cepas clínicas de *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei* resistentes aos azóis. Entre as diferentes formulações dos possíveis agentes antifúngicos estudados, os óleos essenciais se destacaram pela sua notável efetividade contra os fungos, principalmente os OEs de *Cinnamomum cassia* (canela), *Citrus limonum* (limão), *Ocimum basilicum* (manjericão), *Thymus vulgaris* (tomilho), *P. graveolens* (gerânio) e *Eugenia caryophyllus* (cravo). Neste caso os valores de CMM do OE de gerânio foram de 0,07 e 0,62% para *C. albicans*, 0,15 à 1,25% para *C. glabrata* e *C. krusei*, permitindo concluir que o OE de gerânio possui uma boa atividade antimicrobiana em baixas concentrações.

Na literatura consultada não foi possível encontrar estudos avaliando a atividade antifúngica do OE de gerânio sobre a espécie de *C. dubliniensis*, entretanto Santomauro et al. (2016) por exemplo, conseguiram comprovar a sensibilidade desta espécie ao OE de artemísia. Os autores avaliaram a eficácia do OE de *Artemisia annua* (artemísia) sobre cepas clínicas e de referência de *Candida* spp. e obtiveram o valor de CMM de 25 µL/mL para *C. dubliniensis* (cepa clínica), *C. albicans* (ATCC 90028) e *C. krusei* (cepa clínica) enquanto o valor de CMM contra a cepa de referência

ATCC 6258 de *C. krusei* foi de 12,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$.

A avaliação do potencial antibacteriano do OE de gerânio sobre cepas de *S. mutans* também é restrita na literatura. Coronado-López et al. (2018) determinaram a atividade antimicrobiana de três extratos metanólicos de gerânio, porém de outra espécie, o *Pelargonium peltatum*, extraídos das folhas, caule e raiz, sobre *S. mutans* e *Streptococcus sanguinis*. Os autores determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos por meio do método de microdiluição em caldo e chegaram aos seguintes valores: os valores de CIM dos extratos extraídos das folhas e raízes foram 250 mg/mL para *S. mutans* e 125 mg/mL para *S. sanguinis* e a CIM do extrato extraído do caule foi de 125 mg/mL para *S. mutans* e 31 mg/mL para *S. sanguinis*. A zona de inibição também foi determinada e o maior diâmetro foi o de extrato coletado da raiz da planta, que inibiu 28,8 mm de crescimento de *S. mutans* e 32,1 mm de crescimento de *S. sanguinis*. Já Lapinska et al. (2020) exploraram a atividade antifúngica e a atividade antibacteriana do OE de gerânio (*P. graveolens*) e de outros 9 OEs contra microrganismos orais como *S. mutans* e *C. albicans*. Para determinar a atividade antimicrobiana, os autores optaram pelo método de ágar difusão. O OE de gerânio apresentou zonas de inibição para *S. mutans* e *C. albicans*, confirmando a sua atividade contra essas cepas. Além disso o OE apresentou citronelol (26,7%) e geraniol (13,4%) em maiores concentrações o que concorda com o OE utilizado no presente estudo.

Um estudo verificou a atividade antimicrobiana do OE de gerânio (*P. graveolens*) contra cepas clínicas e cepa padrão ATCC de *S. aureus*. Apesar dos valores de CMM não terem sido disponibilizados, podemos considerar os valores de CIM para esta discussão. O OE de gerânio se apresentou bastante efetivo contra as cepas de *S. aureus*, bem como no presente estudo. O valor de CIM do óleo sobre a cepa padrão foi de 0,25 $\mu\text{L}/\text{mL}$, enquanto para as cepas clínicas, o valor de CIM para a maioria foi de 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Vale ressaltar que dentre as 70 cepas clínicas coletadas, 47 foram sensíveis ao OE (Bigos et al., 2012). Algumas diferenças devem ser consideradas: o etanol foi escolhido como o solvente para diluição do OE e a metodologia utilizada para a realização do experimento foi a de ágar diluição. Ainda assim, mais uma vez é constatada a atividade antimicrobiana do OE de gerânio. Seguindo a mesma metodologia que o estudo anterior, Rosato et al. (2007) verificaram a atividade antimicrobiana de OEs e seu sinergismo com o norfloxacin. Para a

diluição dos OEs, foram utilizados 0,5% de *Tween 20*, assim como empregado no nosso estudo. A aplicação do OE de *P. graveolens* sozinho teve atividade antimicrobiana sobre as cepas ATCC de *S. aureus* (CIM de 0,72 mg/mL) e quando combinado com o norfloxacino resultou em efeito sinérgico para três cepas: *S. aureus* ATCC 6538, *S. aureus* ATCC 29213 e *Bacillus cereus* ATCC 11778. Tal como o OE de gerânio resultou em 3 interações aditivas e 1 sinérgicas quando foi combinado com o OE de *lemongrass* contra *S. aureus* em nosso estudo. Não obstante, mais uma vez é fundamentado o potencial antimicrobiano do OE de *P. graveolens*.

O OE de *lemongrass* pode ser obtido de diferentes espécies de *Cymbopogon*. Não foi possível encontrar na literatura pesquisada, estudos que direcionassem o OE de *C. schoenanthus* sobre os microrganismos explorados em nosso estudo (*Candida albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis* e *Streptococcus mutans*) com exceção de *Staphylococcus aureus* que ainda será discutido nesta seção.

Devido a diversidade de OEs de *Cymbopogon* disponíveis no mercado, foram encontrados estudos com OEs deste gênero sobre *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *S. mutans* e *S. aureus*. Piasecki et al. (2021) compararam a composição química dos OEs de *Cymbopogon nardus*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon flexuosus*, *C. schoenanthus*, *Cymbopogon martinii* e *Cymbopogon giganteus*. Mediante à análise de cromatografia em camada fina (TLC) e à espectrometria de massa (MS), os OEs podem ser classificados em 5 tipos de quimiotipos. O OE de *C. schoenanthus* (da mesma espécie utilizada em nosso estudo) bem como *C. citratus* e *C. flexuosus* utilizados no estudo foram classificados como quimiotipo II (ChT II). Neste quimiotipo, os aldeídos monoterpênicos neral e geranial são os compostos mais presentes, assim como o OE utilizado no presente estudo. Com o quimiotipo dos OEs estabelecidos, os autores selecionaram 1 OE de cada quimiotipo para comparar sua atividade antimicrobiana contra *S. aureus* resistentes à meticilina. Interessantemente de todos os quimiotipos, o tipo mais eficaz contra *S. aureus* foi o ChT II (*C. schoenanthus*, *C. citratus* e *C. flexuosus*). Embora o OE selecionado para representar este quimiotipo tenha sido o de *C. flexuosus*, a semelhança na composição química entre os OEs utilizados devem ser consideradas.

Gao et al. (2020) estudaram a eficácia do OE de *lemongrass* (*C. flexuosus*) sobre cultura planctônica de *S. aureus* e *C. albicans*. Mais uma vez os componentes principais são: neral (30,3%) e geranial (29,3%). O OE foi submetido ao teste de

suscetibilidade em cultura planctônica por meio do método de microdiluição seriada. Neste, a suspensão bacteriana foi padronizada em 1×10^5 e como meio de cultura foram utilizados YPD (*Yeast extract – Peptone - Dextrose*) para *C. albicans* e Caldo BHI para *S. aureus*. Já no presente estudo os microrganismos foram padronizados em 10^6 células/mL e como meio de cultura foram utilizados RPMI 1640 e caldo MH para *C. albicans* e *S. aureus*, respectivamente, de acordo com CLSI norma M27-A2 e M7-A6. Os autores não determinaram a CMM e por tanto os valores de CIM, que foi de 0,07% para ambas as cepas serão consideradas. O valor de CIM para *C. albicans* corroboram com os nossos resultados, enquanto para *S. aureus* os valores obtidos no presente estudo foram mais altos. Esta diferença pode ser explicada pelas desigualdades destacadas acima na metodologia e também pela própria diversidade na espécie da planta utilizada (apesar da semelhança de seus principais constituintes).

C. schoenanthus foi avaliado sobre cultura planctônica de *S. aureus* pelo método de microdiluição em caldo para determinação da CIM. Para tanto, o OE foi diluído em 5% de DMSO e também apresentou atividade antimicrobiana contra o microrganismo. Segundo os autores, a planta utilizada para extração do óleo foi coletada em Cordofão (Sudão) e os principais constituintes do OE utilizado são 18,48% de piperitona e 18,33% de elemol (Yagi et al., 2016). Malti et al. (2020) também verificaram a atividade antimicrobiana do OE de *C. schoenanthus* sobre *S. aureus* e *C. albicans*. Para isto, os autores separaram o OE em dois grupos de acordo com seus constituintes principais. Assim, o grupo I trata-se do OE composto predominantemente por 20,2% de cis-p-menth-2-en-1-ol e 14% de trans-p-Menth-2-en-1-ol enquanto no OE do grupo II há 25% cis-p-menth-2-en-1-ol e 15,4% trans-p-Menth-2-en-1-ol. Os valores de CIM foram de 0,5 $\mu\text{L/mL}$ do grupo I e II para *S. aureus* e de 4 $\mu\text{L/mL}$ do grupo I e 3 $\mu\text{L/mL}$ do grupo II para *C. albicans*. Isto mostra que até mesmo uma pequena variação na composição química do OE pode ser o suficiente para impactar na sua atividade biológica. A eficácia do OE de *C. schoenanthus* foi evidenciada também por Hashim et al. (2017) que avaliaram a efetividade do OE de *C. schoenanthus* sobre cepas de *S. aureus* sensíveis à meticilina e *S. aureus* resistentes à meticilina. O OE apresentou valor de CIM para ambas as cepas (2,34 $\mu\text{g/mL}$), mostrando que possui atividade até mesmo sobre cepas com perfil de resistência.

Em relação a *C. krusei* foi possível encontrar na literatura consultada, apenas 2 estudos que avaliaram a efetividade da planta do gênero *Cymbopogon*. Neste estudo, os autores avaliaram o extrato e o OE de *Cymbopogon citratus*, *Aeollanthus suaveolens*, *Caryophyllus aromaticus*, *Matricaria camomila*, *Pithecellobium avaremotemo*, *Plectranthus amboinicus* e *Ruta graveolens* sobre *S. aureus*, *C. albicans* e *C. krusei*. Os extratos foram avaliados nas concentrações de 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156 e 78 µg/mL e os OE nas concentrações de 8, 4, 2, 1, 0,5 e 0,25%. Como solvente foi utilizado o DMSO na concentração máxima de 10%. *Cymbopogon citratus* não apresentou nenhuma atividade antimicrobiana nas concentrações testadas contra as cepas deste estudo, em contrapartida os OEs de *C. aromaticus* e *M. camomila* demonstraram valor de CIM de 8% para a maioria das cepas de *S. aureus*, *C. albicans* e *C. krusei* (Nogueira et al., 2008). É importante ressaltar que esse valor é cerca de 2 vezes (ou mais) maior que o valor de CMM dos OEs utilizados em nosso estudo, o que sugere uma maior sensibilidade dos microrganismos *S. aureus*, *C. albicans* e *C. krusei* aos OEs de *C. schoenanthus* e *P. graveolens*.

Szweda et al. (2015) avaliaram 37 OEs foram avaliados sobre cepas clínica de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata* e *C. krusei*), dentre eles, os óleos de *Cymbopogon nardus* (citronela) e *P. graveolens* (gerânio) foram testados. Do total, apenas oito agentes resultaram em atividade antifúngica e o OE de gerânio foi um deles, que apresentou atividade contra as três espécies de *Candida*. Este resultado reforça mais uma vez os resultados obtidos nesta pesquisa. Já o OE de *C. nardus* não apresentou eficácia contra as cepas fúngicas, enquanto *C. schoenanthus*, apesar de pertencer ao mesmo gênero, se destacou por sua aplicabilidade contra os fungos.

O OE de *C. citratus* foi avaliado sobre *S. mutans* por de Oliveira et al. (2017). Tendo como componente principal o geranial (46,6%) e o neral (34,1%) o OE de *C. citratus* expressou atividade antimicrobiana contra *S. mutans* (CMM de 10,54 mg/mL). Os autores ainda verificaram a ação antimicrobiana dos componentes principais de forma isolada e sugerem que o potencial antimicrobiano do OE de *C. citratus* se deve, sobretudo, pela presença do citral (geranial e neral). Com isto podemos sugerir também, dado que o geranial e neral são um dos componentes mais abundantes do OE de *lemongrass* utilizados no presente estudo, que a atividade antimicrobiana demonstrada em nossos resultados provavelmente se dá pela alta concentração destes constituintes.

Em relação a *C. dubliniensis* não foram encontrados nenhum estudo com o OE do gênero *Cymbopogon* sobre essa cepa. Contudo é possível encontrar na literatura estudo com outro OE e *C. dubliniensis*: A atividade antifúngica do OE de *Cinnamomum verum* foi testado sobre *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. dubliniensis*. Para a realização das análises o OE foi diluído em *Tween 80* (0,05%). Os valores de CIM foram iguais para todas as cepas, sendo de 1 mg/mL. Ainda segundo os autores, nesta mesma concentração, o OE eliminou a formação de biofilme de todas as cepas, por completo (Wijesinghe et al., 2020).

Boa parte dos casos de doenças infecciosas estão relacionados à formação de biofilmes, estrutura formada por uma comunidade de microrganismos que aumenta a capacidade de resistência e virulência quando comparada à cultura planctônica (Dudek-Wicher et al., 2021). Pensando nisso, o efeito antibiofilme dos OEs também foi verificado sobre o biofilme monotípico de *C. albicans*, *C. krusei*, *C. dubliniensis*, *S. aureus* e *S. mutans*. Para tanto, foram considerados os valores de CMM, 2 X CMM e 4 X CMM e foram aplicados pelo tempo de 5 minutos e 24 h.

O tratamento do biofilme de *S. mutans* por 5 min se mostrou dose dependente, assim, apesar de todas as concentrações terem apresentado efetividade sobre o biofilme, a dose mais alta (64%) do OE de *lemongrass* e gerânio apresentaram maiores reduções (74,3% e 70,4% respectivamente). No entanto, ao prolongar o tempo de tratamento para 24 h, a concentração mais baixa, de 16%, exibiu maior eficácia reduzindo 81,6% (*lemongrass*) e 93% (gerânio) do biofilme. A clorexidina reduziu 84,2% e 95% do biofilme pelo tempo de 5 min e 24h respectivamente. Deste modo os OE de gerânio e *lemongrass* demonstraram uma eficácia estatisticamente semelhante à clorexidina.

Acerca do tratamento do biofilme de *S. aureus* por 5 minutos, o OE de *lemongrass* reduziu 44,4%, 53 e 53,9%, enquanto o OE de gerânio reduziu 55,6%, 68,4% e 66,1% nas concentrações de 4, 8 e 16%, respectivamente, não apresentando diferença estatisticamente significante entre si. Já a clorexidina em 100% reduziu 81,6% do biofilme. O tratamento por 24h mostrou-se mais eficaz, reduzindo 79,1%, 79,9% e 77,6% com OE de *lemongrass* e 81,7%, 85,3% e 83,7% com o OE de gerânio nas mesmas concentrações utilizadas em 5 minutos. A clorexidina em 50% reduziu 87% e não apresentou diferença estatisticamente significante com os demais grupos de tratamento. Considerando que a combinação

dos OEs resultou em interações aditivas e sinérgicas na cultura planctônica de *S. aureus*, estes valores também foram aplicados no biofilme monotípico do microrganismo. Pode-se constatar que o tratamento com as combinações dos óleos pelo tempo de 5 min resultou em reduções que variaram entre 16,8% à 27,3%, enquanto a clorexidina (100%) reduziu 74,2% do biofilme. Por outro lado, todas as combinações dos OEs apresentaram reduções estatisticamente semelhantes à clorexidina no tratamento de 24 h. Neste, as combinações reduziram entre 91,3% à 93,3%, ao passo que a clorexidina reduziu 91,8%.

Em se tratando das espécies de *Candida*, aparentemente *C. krusei* foi o único a apresentar resistência à nistatina. As reduções de biofilme com o tratamento por 5 minutos variaram entre 5,8% à 34,7% para o OE de *lemongrass* testadas nas concentrações entre 0,03 à 0,12% e de 18,6% à 28,1% para o OE de gerânio nas concentrações entre 0,06 à 0,25%. Já o tratamento do biofilme de *C. krusei* por 24h com o OE de *lemongrass* não apresentou nenhuma atividade antifúngica. Ao passo que o OE de gerânio foi eficaz apenas na concentração de 0,25%, no qual reduziu 38,8% do biofilme.

C. albicans foi reduzido entre 27,9% a 47,7% pelo OE de *lemongrass* e entre 18,7% à 48,7% pelo OE de gerânio, ambos os OEs nas concentrações de 0,06 à 0,25% no tratamento de 5 minutos. Vale ressaltar que a nistatina utilizada como controle positivo reduziu apenas 34,7% do biofilme de *C. albicans*. O tratamento do biofilme de *C. albicans* por 24h se mostrou mais eficaz: 92% do biofilme foi reduzido pelo OE de *lemongrass* (0,25%), enquanto a nistatina (50%) reduziu 55,1%. Assim como o OE de *lemongrass*, o OE de gerânio, também reduziu o biofilme de *C. albicans* com diferença estatística entre a nistatina, na concentração de 0,25%, no qual, diminuiu 86,3% do biofilme.

No tratamento de 5 min, a redução do biofilme de *C. dubliniensis* com o OE de *lemongrass* variou de 14,7% até 35,6% com as concentrações variando entre 0,06 e 0,25%. Já o OE de gerânio em 0,03% não apresentou nenhuma atividade antifúngica. As concentrações de 0,06% e de 0,12% reduziram 13,1% e 31,6% respectivamente, enquanto a nistatina (100%) reduziu 41,1%. O OE de *lemongrass* foi mais eficiente no tratamento de 24h do que de 5 minutos, dado que com o tempo de contato maior, a redução variou entre 18,6 à 86,1%. Já o OE de gerânio promoveu redução do biofilme entre 7,8% a 11%.

Segundo Gao et al. (2020), avaliando o efeito do OE de *lemongrass* (*C. flexuosus*) sobre o biofilme heterotípico de *S. aureus* e *C. albicans*, a concentração de 0,31% promoveu a redução de 80% de biomassa, calculado pelo método de coloração com cristal violeta. Também foi verificado a atividade do OE sobre o biofilme monotípico, pelo método de contagem de UFC no qual se chegou nos seguintes valores: A concentração de 0,31% reduziu 97% do biofilme de *C. albicans* e 95% do biofilme de *S. aureus*. Em contrapartida, as concentrações acima de 0,31% apresentaram uma menor atividade antibiofilme. Assim como ocorreu com alguns resultados obtidos durante os ensaios antibiofilme realizados neste estudo. Este processo pode ocorrer quando há uma competitividade entre moléculas que resultam em sua inibição. Assim, quanto maior a concentração, maior a quantidade de moléculas e maior a possibilidade de inibição competitiva (Katano et al., 2014; Schön et al., 2011). O resultado da ação antibiofilme do OE de *C. flexuosus* se mostrou bastante semelhante aos nossos resultados com o OE de *lemongrass* sobre o biofilme de *S. aureus* por 24 h.

Além do estudo realizado em cultura planctônica (citado anteriormente), Piasecki et al. (2021) verificaram também a ação do OE de *C. flexuosus* sobre o biofilme monotípico de *S. aureus* e constatou o valor de 1 mg/mL como Concentração Inibitória Mínima em Biofilme (CIMB) e >16mg/mL de Concentração Mínima para Erradicação de Biofilme (CMEB). Os componentes principais do OE utilizado pelos autores e que são também, os constituintes principais do OE de *C. schoenanthus* utilizado em nosso estudo, citral e geraniol demonstraram os mesmos valores de CIMB e CMEB, novamente sugerindo a atribuição desses elementos para a atividade antimicrobiana.

Com uma metodologia diferente da realizada no presente estudo, a atividade antibiofilme do OE de *C. citratus* foi analisado sobre *S. mutans*. O biofilme foi formado em lâminas de vidro e após formação de biofilme o tratamento foi realizado por 1 minuto. A formação de biofilme e seu posterior tratamento (por 1 minuto) também foi realizado sobre o esmalte dentário, porém, com o citral de forma isolada. Para determinar o efeito do OE e do citral, foi realizada a contagem de colônias e o cálculo de UFC/espécime. Com o tratamento de 1 min. com o OE de *C. citratus* sobre o biofilme formado na lâmina de vidro, verificou-se que apesar de todas as concentrações (2 X CIM, 4 X CIM e 10 X CIM) terem reduzido o biofilme, apenas a

redução obtida pela concentração de 10 X CIM foi estatisticamente significativa. No esmalte dentário o biofilme de *S. mutans* sofreu uma redução estatisticamente significativa quando tratado com o citral (Oliveira et al., 2017). Este dado mais uma vez confirma o poder antimicrobiano do citral, componente abundante no OE de *C. schoenanthus* utilizado nas nossas análises.

O efeito sinérgico antibiofilme dos OEs de gerânio, *R. officinalis* (alecrim) e *Mentha piperita* foram testados sobre cepas de *Acinetobacter baumannii* resistentes à colistina. A combinação do gerânio e alecrim resultou em uma forte interação sinérgica possibilitando a diminuição dos valores de CIM em até 32 x. Em relação ao biofilme, os OEs promoveram redução de até 90% nas concentrações sub-CIM. O estudo destaca o potencial dos OEs, inclusive o de gerânio, até mesmo sobre cepas que já apresentam resistência antimicrobiana, além de demonstrar a aplicabilidade de combinação de OEs potencializando o seu poder antimicrobiano (Kafa et al., 2021), assim como demonstrado no presente estudo sobre o *S. aureus*.

O OE de gerânio também foi avaliado sobre a formação de biofilme de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. krusei* sobre materiais médicos hospitalares. Para as análises foram selecionados os métodos de coloração com cristal violeta para quantificação da biomassa e a técnica de ATP-bioluminescência. O OE de gerânio promoveu reduções em todas as espécies, mas o biofilme de *C. krusei* foi o único em que esta redução não foi estatisticamente significativa (Giongo et al., 2016), assim como ocorreu nos resultados do presente estudo, o que sugere uma maior resistência desta espécie aos OEs.

Deste modo, o potencial antibacteriano e antifúngico dos OEs de gerânio e *lemongrass* sobre patógenos de interesse médico-odontológico ficaram evidentes, sendo importante ampliar os estudos avaliando a ação destes agentes sobre as células humanas e animais, buscando o seu uso de forma segura e eficaz.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos é possível concluir que:

- a) Os óleos essenciais de *P. graveolens* e *C. schoenanthus* possuem atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *S. mutans* e possui atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* em cultura planctônica;
- b) Ambos os OEs promoveram redução significativa do biofilme, com valores de redução semelhante entre si. Em geral, o tratamento por 24 h apresentou maior eficácia do que o tratamento de 5 min para a maioria dos microrganismos;
- c) A combinação dos OEs resultou em concentrações aditivas e sinérgicas para cultura planctônica de *S. aureus*, promovendo redução significativa do biofilme;

Assim, os OEs de gerânio (*P. graveolens*) e lemongrass (*C. schoenanthus*) apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica em cultura planctônica e em biofilmes monotípicos de *S. aureus*, *S. mutans*, *C. albicans*, *C. dubliniensis* e *C. krusei* apresentando potencial para serem utilizados para tratamento de infecções causadas por esses patógenos.

REFERÊNCIAS

- Abdel-Aziz MM, Emam TM, Raafat MM. Hindering of cariogenic *Streptococcus mutans* biofilm by fatty acid array derived from an endophytic *Arthrographis kalrae* strain. *Biomolecules*. 2020 May 25;10(5):811. doi: 10.3390/biom10050811. PMID: 32466324; PMCID: PMC7277960.
- Aleksandra B, Donadu M, Donatella U, Spiric VT, Mazzarello V, Zanetti S, et al. Antifungal activity of *Myrtus communis* against *Malassezia* sp. isolated from the skin of patients with pityriasis versicolor. *Infection*. 2018;46:253–7. doi: 10.1007/s15010-017-1102-4.
- Antonio GD, Tesser CD, Moretti-Pires RO. Phytotherapy in primary health care. *Rev Saúde Pública*. 2014;48(3):541–53. doi: 10.1590/S0034-8910.2014048004985.
- Antonoli G, Fontanella G, Echeverrigaray S, Longaray Delamare AP, Fernandes Pauletti G, Barcellos T. Poly(lactic acid) nanocapsules containing lemongrass essential oil for postharvest decay control: *In vitro* and *in vivo* evaluation against phytopathogenic fungi. *Food Chem*. 2020 Oct 1;326:126997. doi: 10.1016/j.foodchem.2020.126997. Epub 2020 May 7. PMID: 32422511.
- Aziz ZAA, Ahmad A, Setapar SHM, Karakucuk A, Azim MM, Lokhat D, et al. Essential oils: extraction techniques, pharmaceutical and therapeutic potential – a Review. *Curr Drug Metab*. 2018;19(13):1100–10. doi: 10.2174/1389200219666180723144850. PMID: 30039757.
- Barac A, Cevik M, Colovic N, Lekovic D, Stevanovic G, Micic J, et al. Investigation of a healthcare-associated *Candida tropicalis* candidiasis cluster in a haematology unit and a systematic review of nosocomial outbreaks. *Mycoses*. 2020;63(4):326–33. doi: 10.1111/MYC.13048. PMID: 31930592.
- Bigos M, Wasiela M, Kalemba D, Sienkiewicz M. Antimicrobial activity of geranium oil against clinical strains of *Staphylococcus aureus*. *Molecules*. 2012;17:10276–91. doi: 10.3390/molecules170910276. PMID: 22929626.
- Bona AD, Nedel F. Evaluation of *Melia azedarach* extracts against *Streptococcus mutans*. *J Med Food*. 2015;18(2):259–63. doi: 10.1089/JMF.2013.0181. PMID: 25069066.
- Borges RS, Ortiz BLS, Pereira ACM, Keita H, Carvalho JCT. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *J Ethnopharmacol*. 2019;229:29–45. doi: 10.1016/J.JEP.2018.09.038. PMID: 30287195.

Bossou AD, Mangelinckx S, Yedomonhan H, Boko PM, Akogbeto MC, De Kimpe N, et al. Chemical composition and insecticidal activity of plant essential oils from Benin against *Anopheles gambiae* (Giles). *Parasit Vectors*. 2013 Dec 3;6:337. doi: 10.1186/1756-3305-6-337. PMID: 24298981; PMCID: PMC3866997.

Boukhatem MN, Sudha T, Darwish NHE, Nada HG, Mousa SA. Essence aromatique du Géranium Odorant (*Pelargonium graveolens* L'Hérit.) d'Algérie: exploration des propriétés antioxydante, anti-inflammatoire et anticancéreuse (anti-angiogénique et cytotoxique), in vitro et in ovo, vis-à-vis de différentes lignées cellulaires cancéreuses métastatiques [Rose-scented geranium essential oil from Algeria (*Pelargonium graveolens* L'Hérit.): Assessment of antioxidant, anti-inflammatory and anticancer properties against different metastatic cancer cell lines]. *Ann Pharm Fr*. 2021 Jul 24:S0003-4509(21)00096-1. French. doi: 10.1016/j.pharma.2021.07.002. Epub ahead of print. PMID: 34310905

Brochot A, Guilbot A, Haddioui L, Roques C. Antibacterial, antifungal, and antiviral effects of three essential oil blends. *Microbiologyopen*. 2017 Aug;6(4):e00459. doi: 10.1002/mbo3.459. Epub 2017 Mar 14. PMID: 28296357; PMCID: PMC5552930.

Carrol DH, Chassagne F, Dettweiler M, Quave CL. Antibacterial activity of plant species used for oral health against *Porphyromonas gingivalis*. *PLoS One*. 2020 Oct 8;15(10):e0239316. doi: 10.1371/journal.pone.0239316. PMID: 33031410; PMCID: PMC7544490.

Castro CA, Hogan JB, Benson KA, Shehata CW, Landauer MR. Behavioral effects of vehicles: DMSO, ethanol, Tween-20, Tween-80, and emulphor-620. *Pharmacol Biochem Behav*. 1995;50(4):521–6. doi: 10.1016/0091-3057(94)00331-9. PMID: 7617697.

Chaffee BW, Rodrigues PH, Kramer PF, Vítolo MR, Feldens CA. Oral health-related quality-of-life scores differ by socioeconomic status and caries experience. *Community Dent Oral Epidemiol*. 2017;45(3):216–24. doi: 10.1111/CDOE.12279. PMID: 28083880.

Chang J, Lee RE, Lee W. A pursuit of *Staphylococcus aureus* continues: a role of persister cells. *Arch Pharm Res*. 2020;43(6):630–8. doi: 10.1007/S12272-020-01246-X. PMID: 32627141.

Chen H, Zhou X, Ren B, Cheng L. The regulation of hyphae growth in *Candida albicans*. *Virulence*. 2020;11(1):337–48. doi: 10.1080/21505594.2020.1748930. PMID: 32274962.

Clark D, Levin L. In the dental implant era, why do we still bother saving teeth? *Dent Traumatol*. 2019 Dec;35(6):368-75. doi: 10.1111/edt.12492. Epub 2019 Oct 14. PMID: 31132200.

Colombo AL, Júnior JNA, Guinea J. Emerging multidrug-resistant *Candida* species. *Curr Opin Infect Dis*. 2017;30(6):528–38. doi: 10.1097/QCO.0000000000000411. PMID: 29095200.

Coronado-López S, Caballero-García S, Aguilar-Luis MA, Mazulis F, Del Valle-Mendoza J. Antibacterial activity and cytotoxic effect of *Pelargonium peltatum* (geranium) against *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sanguinis*. *Int J Dent*. 2018;2018. doi: 10.1155/2018/2714350. PMID: 30622566.

Dhakad AK, Pandey V V, Beg S, Rawat J, Singh A. Biological, medicinal and toxicological significance of eucalyptus leaf essential oil: a review. *J Sci Food Agric*. 2018;98(3):833–48. doi: 10.1002/JSFA.8600. PMID: 28758221.

Dudek-Wicher R, Paleczny J, Kowalska-Krochmal B, Szymczyk-Ziółkowska P, Pachura N, Szumny A, et al. Activity of liquid and volatile fractions of essential oils against biofilm formed by selected reference strains on polystyrene and hydroxyapatite surfaces. *Pathogens*. 2021 Apr 23;10(5):515. doi: 10.3390/pathogens10050515. PMID: 33922823; PMCID: PMC8145098.

Ekpenyong CE, Akpan E, Nyoh A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chin J Nat Med*. 2015;13(5):321–37. doi: 10.1016/S1875-5364(15)30023-6. PMID: 25986281.

Falzon CC, Balabanova A. Phytotherapy: An introduction to herbal medicine. *Prim Care*. 2017 Jun;44(2):217-27. doi: 10.1016/j.pop.2017.02.001. PMID: 28501226.

Faria DR, Sakita KM, Capoci IRG, Arita GS, Rodrigues-Vendramini FAV, de Oliveira Junior AG, et al. Promising antifungal activity of new oxadiazole against *Candida krusei*. *PLoS One*. 2020 Jan 14;15(1):e0227876. doi: 10.1371/journal.pone.0227876. PMID: 31935275; PMCID: PMC6959663.

Farrar AJ, Farrar FC. Clinical aromatherapy. *Nurs Clin North Am*. 2020;55(4):489–504. doi: 10.1016/J.CNUR.2020.06.015. PMID: 33131627.

Firoozeh F, Omidi M, Saffari M, Sedaghat H, Zibaei M. Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolates from four teaching hospitals in Iran: the emergence of novel MRSA clones. *Antimicrob Resist Infect Control*. 2020 Jul 17;9(1):112. doi: 10.1186/s13756-020-00777-8. PMID: 32680563; PMCID: PMC7367364.

Fratini F, Mancini S, Turchi B, Friscia E, Pistelli L, Giusti G, et al. A novel interpretation of the fractional inhibitory concentration index: The case *Origanum vulgare* L. and *Leptospermum scoparium* J. R. et G. Forst essential oils against *Staphylococcus aureus* strains. *Microbiol Res*. 2017;195:11–7. doi: 10.1016/j.micres.2016.11.005. PMID: 28024521.

Frieri M, Kumar K, Boutin A. Antibiotic resistance. *J Infect Public Health*. 2017;10(4):369–78. doi: 10.1016/J.JIPH.2016.08.007. PMID: 27616769.

Galappathie S, Edwards DJ, Elliott AG, Cooper MA, Palombo EA, Butler MS, et al. Antibacterial nerol cinnamates from the Australian plant *Eremophila longifolia*. *J Nat Prod*. 2017;80(4):1178–81. doi: 10.1021/ACS.JNATPROD.6B00888. PMID: 28257200.

Gao S, Liu G, Li J, Chen J, Li L, Li Z, et al. Antimicrobial activity of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and its active component citral against dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* species. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10. doi: 10.3389/FCIMB.2020.603858. PMID: 33415085.

Gaonkar R, Shiralgi Y, Lakkappa DB, Hegde G. Essential oil from *Cymbopogon flexuosus* as the potential inhibitor for HSP90. *Toxicol reports*. 2018;5:489–96. doi: 10.1016/J.TOXREP.2018.03.014. PMID: 29854620.

Garau J, Bassetti M. Role of pharmacists in antimicrobial stewardship programmes. *Int J Clin Pharm*. 2018;40(5):948–52. doi: 10.1007/S11096-018-0675-Z. PMID: 30242589.

Gerstel J, Turner T, Ruiz G, Wise J, Stein A, Jones G, et al. Identification of botanicals with potential therapeutic use against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infections. *Phytother Res*. 2018;32(12):2577–85. doi: 10.1002/PTR.6198. PMID: 30251279.

Giongo JL, Vaucher R de A, Fausto VP, Quatrin PM, Lopes LQS, Santos RCV, et al. Anti-Candida activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. *Microb Pathog*. 2016;100:170–8. doi: 10.1016/J.MICPATH.2016.08.013. PMID: 27544324.

Guandalini Cunha B, Duque C, Sampaio Caiaffa K, Massunari L, Araguê Catanoze I, Dos Santos DM, et al. 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*. 2020 Jan;109:104577. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104577. Epub 2019 Sep 26. PMID: 31606567.

Gucwa K, Milewski S, Dymerski T, Szweida P. Investigation of the antifungal activity and mode of action of *Thymus Vulgaris*, *Citrus Limonum*, *Pelargonium Graveolens*, *Cinnamomum Cassia*, *Ocimum Basilicum*, and *Eugenia Caryophyllus* essential oils. *Molecules*. 2018 May 8;23(5):1116. doi: 10.3390/molecules23051116. PMID: 29738503; PMCID: PMC6099571.

Guo Y, Song G, Sun M, Wang J, Wang Y. Prevalence and therapies of antibiotic-resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020 Mar 17;10:107. doi: 10.3389/fcimb.2020.00107. PMID: 32257966; PMCID: PMC7089872.

Halcón L, Milkus K. *Staphylococcus aureus* and wounds: a review of tea tree oil as a promising antimicrobial. *Am J Infect Control*. 2004;32(7):402–8. doi: 10.1016/S0196655304003657. PMID: 15525915.

Hashim GM, Almasaudi SB, Azhar E, Jaouni SK Al, Harakeh S. Biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil. *Saudi J Biol Sci*. 2017;24(7):1458–64. doi: 10.1016/J.SJBS.2016.06.001. PMID: 30294213.

Hsouna AB, Hamdi N. Phytochemical composition and antimicrobial activities of the essential oils and organic extracts from *Pelargonium graveolens* growing in Tunisia. *Lipids Health Dis*. 2012 Dec 5;11;167. doi: 10.1186/1476-511X-11-167. PMID: 23216669; PMCID: PMC3539951.

Islam MT, Quispe C, Islam MA, Ali ES, Saha S, Asha UH, et al. Effects of nerol on paracetamol-induced liver damage in wistar albino rats. *Biomed Pharmacother*. 2021;140. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2021.111732. PMID: 34130201.

Jiang W, Wang Y, Luo J, Li X, Zhou X, Li W, et al. Effects of antimicrobial peptide GH12 on the cariogenic properties and composition of a cariogenic multispecies biofilm. *Appl Environ Microbiol*. 2018 Nov 30;84(24):e01423-18. doi: 10.1128/AEM.01423-18. PMID: 30341079; PMCID: PMC6275336.

Kafa AHT, Aslan R, Celik C, Hasbek M. Antimicrobial synergism and antibiofilm activities of *Pelargonium graveolens*, *Rosemary officinalis*, and *Mentha piperita* essential oils against extreme drug-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Z Naturforsch C J Biosci*. 2021 Jun 17;77(3-4):95-104. doi: 10.1515/znc-2021-0079. PMID: 34142518.

Kardan-Yamchi J, Mahboubi M, Kazemian H, Hamzelou G, Feizabadi MM. The chemical composition and anti-mycobacterial activities of *Trachyspermum copticum* and *Pelargonium graveolens* essential oils. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*. 2020;15(1):68–74. doi: 10.2174/1574891X14666191028113321. PMID: 31657682
Katano T, Ito Y, Ohta K, Yasujima T, Inoue K, Yuasa H. Competitive inhibition of AQP7-mediated glycerol transport by glycerol derivatives. *Drug Metab Pharmacokinet*. 2014;29(4):348–51. doi: 10.2133/DMPK.DMPK-13-NT-139. PMID: 24492673.

Katiki LM, Chagas ACS, Bizzo HR, Ferreira JFS, Amarante AFT. Anthelmintic activity of *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon schoenanthus* and *Mentha piperita* essential oils evaluated in four different in vitro tests. *Vet Parasitol*. 2011;183(1–2):103–8. doi: 10.1016/J.VETPAR.2011.07.001. PMID: 21820807.

Kaur H, Shankarnarayana SA, Hallur V, Muralidharan J, Biswal M, Ghosh AK, et al. Prolonged outbreak of *Candida krusei* candidemia in paediatric ward of tertiary care hospital. *Mycopathologia*. 2020;185(2):257–68. doi: 10.1007/S11046-020-00427-Y. PMID: 31983047.

Kernien JF, Snarr BD, Sheppard DC, Nett JE. The Interface between Fungal biofilms and innate immunity. *Front Immunol*. 2018;8:1968. doi: 10.3389/FIMMU.2017.01968. PMID: 29375581.

Khadka S, Khan S, King A, Goldberg LR, Crocombe L, Bettiol S. Poor oral hygiene, oral microorganisms and aspiration pneumonia risk in older people in residential aged care: a systematic review. *Age Ageing*. 2021;50(1):81–7. doi: 10.1093/AGEING/AFAA102. PMID: 32677660.

Khatri SG, Samuel SR, Acharya S, Patil ST. Antiplaque, antifungal effectiveness of aloe vera among intellectually disabled adolescents: Pilot Study. *Pediatr Dent*. 2017;39(7):434–8. PMID: 29335048.

Kozics K, Bučková M, Puškárová A, Kalászová V, Cabicarová T, Pangallo D. The effect of ten essential oils on several cutaneous drug-resistant microorganisms and their cyto/genotoxic and antioxidant properties. *Molecules*. 2019;24(24). doi: 10.3390/MOLECULES24244570. PMID: 31847159.

Kramer A-CA, Petzold M, Hakeberg M, Östberg A-L. Multiple socioeconomic factors and dental caries in Swedish children and adolescents. *Caries Res*. 2018;52(1–2):42–50. doi: 10.1159/000481411. PMID: 29237152.

Kumar M. Multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, India, 2013–2015. *Emerg Infect Dis*. 2016;22(9):1666–7. doi: 10.3201/EID2209.160044. PMID: 27532265.

Lapinska B, Szram A, Zarzycka B, Grzegorzczak J, Hardan L, Sokolowski J, et al. An *in vitro* study on the antimicrobial properties of essential oil modified resin composite against oral pathogens. *Mater (Basel, Switzerland)*. 2020;13(19):1–18. doi: 10.3390/MA13194383. PMID: 33019681.

Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, et al. The biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol Spectr*. 2019;7(1). doi: 10.1128/MICROBIOLSPEC.GPP3-0051-2018. PMID: 30657107.

Li J, Wu T, Peng W, Zhu Y. Effects of resveratrol on cariogenic virulence properties of *Streptococcus mutans*. *BMC Microbiol*. 2020;20(1). doi: 10.1186/S12866-020-01761-3. PMID: 32303183.

Li Y, Sun L, Lu C, Gong Y, Li M, Sun S. Promising antifungal targets against *Candida albicans* based on ion homeostasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8(286). doi: 10.3389/FCIMB.2018.00286. PMID: 30234023.

Lima BP, Hu LI, Vreeman GW, Weibel DB, Lux R. The oral bacterium *Fusobacterium nucleatum* binds *Staphylococcus aureus* and alters expression of the staphylococcal accessory regulator sara. *Microb Ecol*. 2019;78(2):336–47. doi: 10.1007/S00248-018-1291-0. PMID: 30474730.

Logan C, Martin-Loeches I, Bicanic T. Invasive candidiasis in critical care: challenges and future directions. *Intensive Care Med.* 2020;46(11):2001–14. doi: 10.1007/S00134-020-06240-X. PMID: 32990778.

Lohse MB, Gulati M, Johnson AD, Nobile CJ. Development and regulation of single- and multi-species *Candida albicans* biofilms. *Nat Rev Microbiol.* 2018;16(1):19–31. doi: 10.1038/NRMICRO.2017.107. PMID: 29062072.

Łysakowska ME, Sienkiewicz M, Banaszek K, Sokołowski J. The Sensitivity of endodontic *Enterococcus* spp. strains to geranium essential oil. *Molecules.* 2015;20(12):22881–9. doi: 10.3390/MOLECULES201219888. PMID: 26703546.

Lyu X, Zhao C, Yan Z-M, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:1161–71. doi: 10.2147/DDDT.S100795. PMID: 27042008.

Maczka W, Winska K, Grabarczyk M. One hundred faces of geraniol. *Molecules.* 2020;25(14). doi: 10.3390/MOLECULES25143303. PMID: 32708169.

Malik T, Singh P, Pant S, Chauhan N, Lohani H. Potentiation of antimicrobial activity of ciprofloxacin by *Pelargonium graveolens* essential oil against selected uropathogens. *Phytother Res.* 2011;25(8):1225–8. doi: 10.1002/PTR.3479. PMID: 21618302.

Malti CEW, Hacı IA El, Hassani F, Paoli M, Gibernau M, Tomi F, et al. Composition, chemical variability and biological activity of *Cymbopogon schoenanthus* essential oil from central Algeria. *Chem Biodivers.* 2020;17(6). doi: 10.1002/CBDV.202000138. PMID: 32286731.

Matsumoto-Nakano M, Nagayama K, Kitagori H, Fujita K, Inagaki S, Takashima Y, et al. Inhibitory effects of *Oenothera biennis* (evening primrose) seed extract on *Streptococcus mutans* and *S. mutans*-induced dental caries in rats. *Caries Res.* 2011;45(1):56–63. doi: 10.1159/000323376. PMID: 21311187.

McGuinness WA, Malachowa N, DeLeo FR. Vancomycin resistance in *Staphylococcus aureus*. *Yale J Biol Med.* 2017;90(2):269–81. PMID: 28656013.

Meccatti VM, De Oliveira JR, Figueira LW, Netto AAL, Zamarioli LS, Marcucci MC, et al. *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract has antibiofilm effect similar to the antifungal nystatin on *Candida* samples. *An Acad Bras Cienc.* 2021;93(2). doi: 10.1590/0001-3765202120190366. PMID: 33950151.

Mendes Hacke AC, Miyoshi E, Marques JA, Pereira RP. Anxiolytic properties of *Cymbopogon citratus* (DC.) stapf extract, essential oil and its constituents in zebrafish (*Danio rerio*). *J Ethnopharmacol.* 2020 Oct 5;260:113036. doi: 10.1016/j.jep.2020.113036. Epub 2020 May 28. PMID: 32473367.

Mohamed AA, Lu X-L, Mounmin FA. Diagnosis and treatment of esophageal candidiasis: current updates. *Can J Gastroenterol Hepatol*. 2019;2019. doi: 10.1155/2019/3585136. PMID: 31772927.

Mohammed YHE, Manukumar HM, Rakesh KP, Karthik CS, Mallu P, Qin HL. Vision for medicine: *Staphylococcus aureus* biofilm war and unlocking key's for anti-biofilm drug development. *Microb Pathog*. 2018;123:339–47. doi: 10.1016/J.MICPATH.2018.07.002. PMID: 30057355.

Mohanty R, Asopa S, Joseph Md, Singh B, Rajguru J, Saidath K, et al. Red complex: Polymicrobial conglomerate in oral flora: A review. *J Fam Med Prim Care*. 2019;8(11):3480–6. doi: 10.4103/jfmprc.jfmprc_759_19.

Morris JB. Review of antimicrobial and other health effects in 5 essential oil producing grass species. *J Diet Suppl*. 2021:1–14. doi: 10.1080/19390211.2021.1944422. PMID: 34219586.

Muller JAI, Matias R, Guilhermino JF, Moreira DL, Santos KS Dos, Fermiano MH, et al. The effect of *Sebastiania hispida* gel on wound model infected by methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Biomed Pharmacother*. 2018;105:1311–7. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2018.06.100. PMID: 30021368.

Nogueira JCR, Diniz MDFM, Lima EO. *In vitro* antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2008;74(1):118–24. doi: 10.1016/S1808-8694(15)30761-8. PMID: 18392512.

Odds FC. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J Antimicrob Chemother*. 2003;52(1):1–1. doi: 10.1093/jac/dkg301. PMID: 12805255.

de Oliveira JR, de Jesus D, Figueira LW, de Oliveira FE, Pacheco Soares C, Camargo SEA, et al. Biological activities of *Rosmarinus officinalis* L. (rosemary) extract as analyzed in microorganisms and cells. *Exp Biol Med*. 2017;242(6):625–34. doi: 10.1177/1535370216688571. PMID: 28093936.

Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res*. 2017;31. doi: 10.1590/1807-3107BOR-2017.VOL31.0089. PMID: 29116300.

Philip N, Bandara HMHN, Leishman SJ, Walsh LJ. Inhibitory effects of fruit berry extracts on *Streptococcus mutans* biofilms. *Eur J Oral Sci*. 2019;127(2):122–9. doi: 10.1111/EOS.12602. PMID: 30592324.

Piasecki B, Biernasiuk A, Skiba A, Skalicka-Woźniak K, Ludwiczuk A. Composition, anti-mrsa activity and toxicity of essential oils from *Cymbopogon* species. *Molecules*. 2021;26(24):7542. doi: 10.3390/MOLECULES26247542. PMID: 34946632.

Pieri FA, Mussi MC, Fiorini JE, Moreira MAS, Schneedorf JM. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Braz Dent J*. 2012;23(1):36–8. doi: 10.1590/S0103-64402012000100006. PMID: 22460312.

Qian W, Liu M, Fu Y, Wang T, Zhang J, Yang M, et al. Antimicrobial and antibiofilm activities of citral against carbapenem-resistant *Enterobacter cloacae*. *Foodborne Pathog Dis*. 2020;17(7):459–65. doi: 10.1089/FPD.2019.2751. PMID: 31985261.

Rodrigues CF, Rodrigues ME, Henriques MCR. Promising alternative therapeutics for oral candidiasis. *Curr Med Chem*. 2019;26(14):2515–28. doi: 10.2174/0929867325666180601102333. PMID: 29852856.

Romero-Cerecero O, Islas-Garduño AL, Zamilpa A, Tortoriello J. Effectiveness of *Ageratina pichinchensis* extract in patients with vulvovaginal candidiasis. A randomized, double-blind, and controlled pilot study. *Phytother Res*. 2017;31(6):885–90. doi: 10.1002/PTR.5802. PMID: 28299831.

Rosato A, Vitali C, De Laurentis N, Armenise D, Milillo MA. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with norfloxacin. *Phytomedicine*. 2007;14(11):727–32. doi: 10.1016/J.PHYMED.2007.01.005. PMID: 17303397.

Sahal G, Woerdenbag HJ, Hinrichs WLJ, Visser A, Tepper PG, Quax WJ, et al. Antifungal and biofilm inhibitory effect of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) essential oil on biofilm forming by *Candida tropicalis* isolates; an *in vitro* study. *J Ethnopharmacol*. 2020;246(112188). doi: 10.1016/J.JEP.2019.112188. PMID: 31470085.

Salehi B, Lopez-Jornet P, López EP-F, Calina D, Sharifi-Rad M, Ramírez-Alarcón K, et al. Plant-derived bioactives in oral mucosal lesions: A key emphasis to curcumin, lycopene, chamomile, aloe vera, green tea and coffee properties. *Biomolecules*. 2019;9(3). doi: 10.3390/BIOM9030106. PMID: 30884918.

Santomauro F, Donato R, Sacco C, Pini G, Flamini G, Bilia AR. Vapour and liquid-phase *Artemisia annua* essential oil activities against several clinical strains of *Candida*. *Planta Med*. 2016;82(11–12):1016–20. doi: 10.1055/S-0042-108740. PMID: 27286334.

Scharnow AM, Solinski AE, Wuest WM. Targeting *S. mutans* biofilms: a perspective on preventing dental caries. *Medchemcomm*. 2019;10(7):1057–67. doi: 10.1039/C9MD00015A. PMID: 31391878.

Schnitzler P. Essential oils for the treatment of herpes simplex virus infections. *Chemotherapy*. 2019;64(1):1–7. doi: 10.1159/000501062. PMID: 31234166.

Schön A, Lam SY, Freire E. Thermodynamics-based drug design: strategies for

inhibiting protein-protein interactions. *Future Med Chem.* 2011;3(9):1129–37. doi: 10.4155/FMC.11.81. PMID: 21806377.

Selwitz RH, Ismail AI, Pitts NB. Dental caries. *Lancet.* 2007;369:51–9. doi: 10.1016/S0140-6736(07)60031-2. PMID: 17208642.

Sharma R, Rao R, Kumar S, Mahant S, Khatkar S. Therapeutic potential of citronella essential oil: a review. *Curr Drug Discov Technol.* 2019;16(4):330–9. doi: 10.2174/1570163815666180718095041. PMID: 30019646.

Sidhu P, Shankargouda S, Rath A, Ramamurthy PH, Fernandes B, Singh AK. Therapeutic benefits of liquorice in dentistry. *J Ayurveda Integr Med.* 2020;11(1):82–8. doi: 10.1016/J.JAIM.2017.12.004. PMID: 30391123.

Silveira D, Prieto-Garcia JM, Boylan F, Estrada O, Fonseca-Bazzo YM, Jamal CM, et al. COVID-19: is there evidence for the use of herbal medicines as adjuvant symptomatic therapy? *Front Pharmacol.* 2020;11. doi: 10.3389/FPHAR.2020.581840. PMID: 33071794.

Spengler C, Thewes N, Nolle F, Faidt T, Umanskaya N, Hannig M, et al. Enhanced adhesion of *Streptococcus mutans* to hydroxyapatite after exposure to saliva. *J Mol Recognit.* 2017;30(7). doi: 10.1002/JMR.2615. PMID: 28256775.

Szweda P, Gucwa K, Kurzyk E, Romanowska E, Dzierzanowska-Fangrat K, Jurek AZ, et al. Essential oils, silver nanoparticles and propolis as alternative agents against fluconazole resistant *Candida albicans*, *Candida glabrata* and *Candida krusei* clinical isolates. *Indian J Microbiol.* 2015;55(2):175–83. doi: 10.1007/s12088-014-0508-2. PMID: 25805904.

Tahir M, Peseski AM, Jordan SJ. Case Report: *Candida dubliniensis* as a cause of chronic meningitis. *Front Neurol.* 2020;11. doi: 10.3389/FNEUR.2020.601242. PMID: 33363510.

Tran HNH, Graham L, Adukwu EC. *In vitro* antifungal activity of *Cinnamomum zeylanicum* bark and leaf essential oils against *Candida albicans* and *Candida auris*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104(20):8911–24. doi: 10.1007/S00253-020-10829-Z.

Tsujii T, Kawada-Matsuo M, Migita H, Ohta K, Oogai Y, Yamasaki Y, et al. Antibacterial activity of phellodendron bark against *Streptococcus mutans*. *Microbiology and Immunology.* 2020;64:424–34. doi: 10.1111/1348-0421.12787. PMID: 32196736

Ušjak D, Ivković B, Božić DD, Bošković L, Milenković M. Antimicrobial activity of novel chalcones and modulation of virulence factors in hospital strains of *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Microb Pathog.*

2019;131(6):186–96. doi: 10.1016/j.micpath.2019.04.015. PMID: 30980878.

Veloso DJ, Abrão F, Martins CHG, Bronzato JD, Gomes BPFA, Higino JS, et al. Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. Arch Oral Biol. 2020;110:104585. doi: 10.1016/j.archoralbio.2019.104585. PMID: 31838294.

Venzon L, Mariano LNB, Somensi LB, Boeing T, Souza P de, Wagner TM, et al. Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. Biomed Pharmacother. 2018;98:118–24. doi: 10.1016/J.BIOPHA.2017.12.020. PMID: 29248831.

Wencewicz TA. Crossroads of antibiotic resistance and biosynthesis. J Mol Biol. 2019;431(18):3370–99. doi: 10.1016/j.jmb.2019.06.033. PMID: 31288031.

Wijesinghe GK, Maia FC, de Oliveira TR, de Feiria SNB, Joia F, Barbosa JP, et al. Effect of *Cinnamomum verum* leaf essential oil on virulence factors of *Candida* species and determination of the *in-vivo* toxicity with *Galleria mellonella* model. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2020;115(8):1–13. doi: 10.1590/0074-02760200349. PMID: 32997002.

Yagi S, Babiker R, Tzanova T, Schohn H. Chemical composition, antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from aromatic plants growing in Sudan. Asian Pac J Trop Med. 2016;9(8):763–70. doi: 10.1016/J.APJTM.2016.06.009. PMID: 27569885.

Zhou K, Li C, Chen D, Pan Y, Tao Y, Qu W, et al. A review on nanosystems as an effective approach against infections of *Staphylococcus aureus*. Int J Nanomedicine. 2018;13:7333–47. doi: 10.2147/IJN.S169935. PMID: 30519018.

ANEXOS

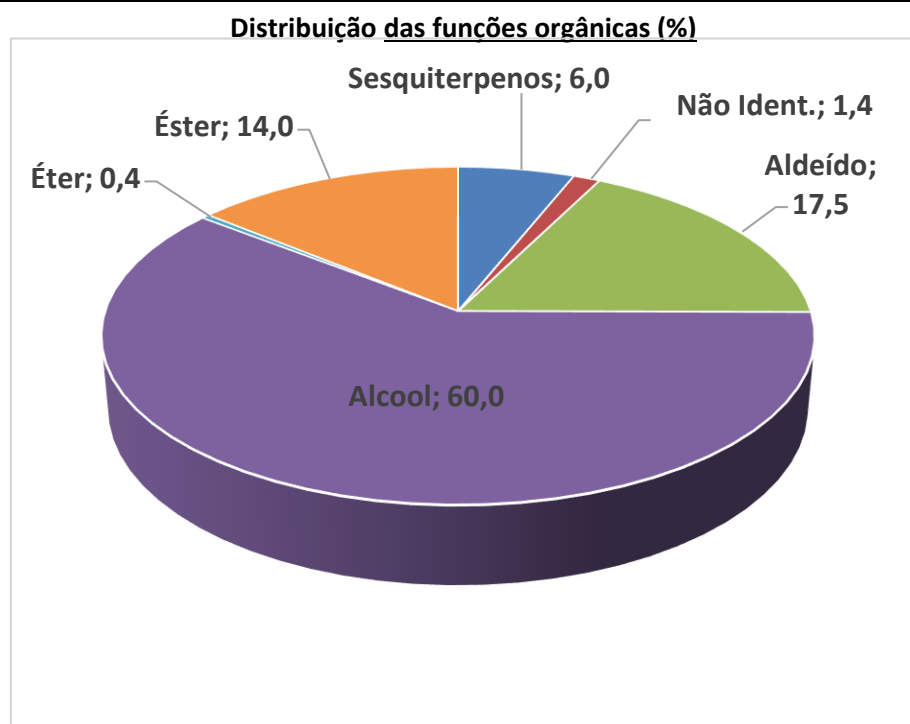
ANEXO A – Perfil analítico do óleo essencial de *Cymbopogon schoenanthus*

Identificação do Produto	
Nome	Óleo essencial Lemongrass
Inci name	Cymbopogon schoenanthus oil
Cas	8007-02-1
Código Interno	PW0015
Nome Botânico	Cymbopogon schoenanthus
Certificação botânica	Não se aplica
Nome Popular	Capim limão, lemongrass, capim santo
Família Botânica	Poaceae
Origem	Monte Verde, MG, Brasil
Órgão da planta	Partes aéreas
Método de extração	Destilação por arraste a vapor
Quimiotipo (QT)	Não se aplica.
Principais componentes	Nerol, acetato de nerol e geranial
Normas reguladoras	Não se aplica.

Análises Físico-químicas				
Lote: 101220				
Análises	Metodologia	Resultado	Especificação	Avaliação
Cor	MACQ001	Amarelo palha	Amarelo palha	Aprovado
Odor	MACQ002	Característico	Característico	Aprovado
Aspecto	MACQ003	Líquido Límpido	Líquido Límpido	Aprovado
Impurezas	MACQ004	Isento	Isento	Aprovado
Densidade	MACQ005	0,888	0,850 – 0,900 g/cm ³	Aprovado
Índice de Refração	MACQ010	1,475	1,465 – 1,485	Aprovado

Cromatografia (CG/MS)	
Condições analíticas	Temperatura do injetor 250°C, Modo e injeção Split, Fluxo 1 mL min ⁻¹ , Gás de arraste: Hélio, Coluna capilar: DB-5MS (30mx0.25mmx0.25µm), Gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60°C - 2min. taxa 4°C/min até 200°C e taxa 6°C/min até 260°C - 10min., Temperatura do detector de massas: 260°C, Temperatura da Fonte de ionização: 280°C e Modo de aquisição: <i>scan</i>
Equipamento	Shimadzu, Modelo GCMS-QP2010 plus
Compostos presentes no óleo essencial e distribuição dos grupos funcionais	<p>Cromatograma – OE Lemongrass</p>

Constituintes Principais	%
Linalol	0,98
citronelal	0,38
verbenol	0,23
4,5 epoxi-careno	0,41
citronelol	2,60
β-citral	6,66
Nerol	56,20
Geranial	10,42
Acetato de citronelol	0,60
Acetato de nerol	13,36
β-elemeno	0,51
β-cariofileno	3,56
Humuleno	0,46
Germacreno -D	0,42
α-amorfeno	0,28
γ-cadineno	0,80
Não Ident,	2,13



Conclusão

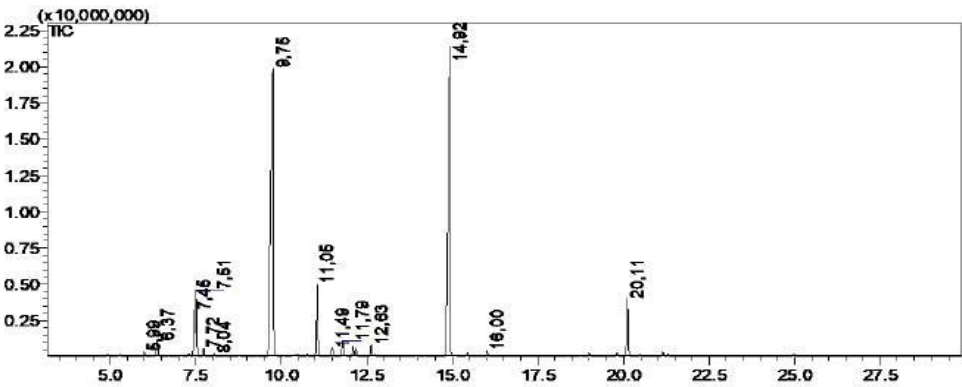
Óleo **aprovado** de acordo com os padrões analíticos de qualidade.

ANEXO B – Perfil analítico do óleo essencial de *Pelargonium graveolens*

Identificação do Produto	
Nome	Óleo Essencial Gerânio Brasil
Inci name	PELARGONIUM GRAVEOLENS OIL
Cas	90082-51-2
Código Interno	PW0191
Nome Botânico	Pelargonium graveolens L'Her
Certificação botânica	herbário da UMC voucher número: 7237
Nome Popular	Malva, pelargônio, gerânio
Família Botânica	Geraniaceae
Origem	Monte Verde, MG, Brasil
Órgão da planta	Folhas e flores
Método de extração	Arraste a vapor
Quimiotipo (QT)	Não se aplica
Principais componentes	Geraniol, Citronelol, Linalol
Normas reguladoras	• ISO 4731:2012

Análises Físico-químicas				
Lote: 101 220				
Análises	Metodologia	Resultado	Especificação	Avaliação
Cor	MACQ001	Levemente amarelado	Incolor, levemente amarelo/esverdeado	Aprovado
Odor	MACQ002	Característico	Característico	Aprovado
Aspecto	MACQ003	Líquido límpido	Líquido límpido	Aprovado
Impurezas	MACQ004	Isento	Isento	Aprovado
Densidade	MACQ005	0,900	0,880 – 0,930 g/cm ³	Aprovado
Índice de Refração	MACQ010	1,469	1,460 – 1,475	Aprovado

Cromatografia (CG/MS)

Condições analíticas	Temperatura do injetor 250°C, Modo e injeção Split, Fluxo 1 mL min ⁻¹ , Gás de arraste: Hélio, Coluna capilar: DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm), Gradiente de temperatura do forno: temperatura inicial 60°C - 2min. taxa 4°C/min até 200°C e taxa 6°C/min até 260°C - 10min., Temperatura do detector de massas: 260°C, Temperatura da Fonte de ionização: 280°C e Modo de aquisição: <i>scan</i>
Equipamento	Shimadzu, Modelo GCMS-QP2010 plus
Compostos presentes no óleo essencial e distribuição dos grupos funcionais	

Constituintes Principais	%
Linalol	10,09
Mentona	0,67
Isomentona	8,4
Mentol	0,39
α-terpineol	0,58
Citronelol	14,21
β-citral	0,47
Geraniol	30,5
Geranial	1,55
Copaeno	1,13
α-bouboneno	5,33
α-guaieno	0,5
β-gurjuneno	4,96
propionato de geranila	1,58
γ-eudesmol	4,82

Distribuição das funções orgânicas (%)	
alcool; 50,5	
sesquiterpenos; 11,9	
monoterpenos; 10,1	
cetona; 9,1	
aldeido; 2,0	
éster; 1,6	

Conclusão

Óleo **aprovado** de acordo com os padrões analíticos de qualidade.