



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Campus de Araçatuba

PEDRO ANTÔNIO DE SOUZA ROLIM

**Potencial antifúngico, antioxidante e irritativo do óleo de citronela
(*Cymbopogon nardus*) associado ao éster fenetil do ácido cafeico
(CAPE)**

Araçatuba – SP

2022

PEDRO ANTÔNIO DE SOUZA ROLIM

Potencial antifúngico, antioxidante e irritativo do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) associado ao éster fenetil do ácido cafeico (CAPE)

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para prova de obtenção de título de Mestre em Ciências Odontológicas - Área de Concentração: Biomateriais.

Orientadora: Profa. Ass. Dra Aimée Maria Guiotti

Coorientador: Professor Associado Valdecir Farias Ximenes

Araçatuba - SP

Catálogo na Publicação (CIP)

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - FOA / UNESP

Rolim, Pedro Antônio de Souza.

R748p Potencial antifúngico, antioxidante e irritativo do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) associado ao éster fenetil do ácido cafeico (CAPE) / Pedro Antônio de Souza Rolim. - Araçatuba, 2022

69f. :il. ; tab.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Odontologia de Araçatuba

Orientadora: Profa. Aimée Maria Guiotti

Coorientador: Prof. Valdecir Faria Ximenes

1. *Cymbopogon* 2. Fitoterapia 3. *Candida albicans*
4. Biofilmes I. T.

Black D15

CDD 617.6

Dedicatória

Dedico aos meus pais, **HEMERSONN e LUCINÉIA**, que me apoiaram em todas etapas da minha vida, sempre estiveram comigo nos bons e maus momentos e que me ensinaram que a vida não seria fácil, mas com coragem e fé os desafios são vencidos.

Agradecimentos

Aos meus pais, **HEMERSONN** e **LUCINÉIA**, que sempre confiaram em mim e mesmo com todas dificuldades sempre fizeram o máximo para eu ter o melhor da vida, sempre carinhosos e motivadores, meu amor eterno por vocês e espero poder retribuir todo esforço que tiveram todos esses anos comigo.

À minha família, que mesmo longe sempre estiveram me apoiando e torcendo por mim, agradeço principalmente às minhas avós **TEREZINHA** e **LUIZA**.

À minha orientadora, **PROFA. DRA. AIMÉE MARIA GUIOTTI**, que em pouco tempo de contato eu aprendi a admirar. Cheguei em Araçatuba para o mestrado totalmente “cru”, sem conhecimento algum sobre como seria a Pós-Graduação, e com muita paciência e zelo ela fez minha jornada pelo mestrado ser mais fácil e mais agradável, não tivemos muito contato pessoalmente (por conta da pandemia), mas ela sempre estava disponível para tirar minhas dúvidas e resolver problemas que eu não conseguia sozinho. Nesse tempo todo que passei pela FOA, toda vez que o nome da Aimée era citado, era só para falar o quão dedicada, inteligente, amável e responsável ela é. Me sinto honrado de tê-la como minha orientadora. Sempre estarei torcendo por você.

Ao meu coorientador, **PROF. DR. VALDECIR FARIA XIMENES**, pela ajuda do desenvolvimento da minha pesquisa, principalmente na parte de testes antioxidantes, sendo sempre muito correto e atencioso com todos os detalhes.

Aos demais professores e colaboradores desse trabalho, Profa. **DÉBORA**, Profa. **CRISTIANE DUQUE**, Profa. **LUCINÉIA** e **THAILA**, que são pessoas muito importantes e que só acrescentaram para o desenvolvimento do mesmo.

À minha amiga **ISABELA CATANOZE**, que esteve comigo durante a jornada do Mestrado, ela foi a pessoa que me ensinou tudo o que sei da parte prática de microbiologia, agradeço pela ajuda e pela paciência que teve comigo durante esse tempo. Passamos muitos momentos bons e ruins (acordando muito cedo, indo fazer descarte e tendo alguns experimentos contaminados), mas me sinto grato de ter te conhecido e desejo tudo de melhor para você.

Aos meus colegas de departamento, **GABRIEL, VIVIANE, CAIO e LÉO**, que estavam sempre no laboratório de odontopediatria e microbiologia e que compartilhei muitos momentos e conversas boas.

Aos demais professores da Instituição que mesmo em pouco tempo de contato consegui absorver muito conhecimento na área de Odontologia e Biomateriais.

À **SEÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA-UNESP** e aos **DEPARTAMENTOS DE ODONTOPEDIATRIA E MATERIAIS ODONTOLÓGICOS**, pelo espaço para realização dos experimentos e pelo suporte que sempre esteve presente.

À **FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARAÇATUBA – UNESP**, pela oportunidade da realização do curso de pós-graduação para obtenção do título de Mestrado.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para o desenvolvimento e conclusão desse trabalho.

"O homem não teria alcançado o possível se, repetidas vezes, não tivesse tentado o impossível."

(Max Weber)

Lista de Abreviaturas

OE – Óleo essencial

CAPE - Éster fenetílico do ácido cafeico

CHX – Clorexidina 0,12

CITRO - Citronela

CX – Controle Xantana

CCP – Controle CAPE

CN – Controle Negativo

C+ - Controle Positivo

CAM - Membrana Corioalantóide

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CFM - Concentração Fungicida Mínima

mg – Miligrama

mL – Mililitro

UFC – Unidades Formadoras de Colônias

FRAP - Ferric Reducing Antioxidant Power

Nmol – Nanomolar

μL - Microlitros

μg - Microgramas

ROLIM, P.A.S. Potencial antifúngico, antioxidante e irritativo do óleo de citronela (*Cymbopogon nardus*) associado ao éster fenetil do ácido cafeico (CAPE). 2022. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo analisar o efeito antifúngico, antioxidante e o potencial irritativo do óleo de citronela associado ou não ao CAPE (Caffeic Acid Phenethyl Ester) para tratamentotópico de candidíase oral. Como metodologia, foi realizado estudo *in vitro* da ação antifúngica de soluções à base de óleo de citronela associado ou não ao CAPE, em cultura planctônica de uma cepa de referência *C. albicans* (ATCC 10231) por meio de ensaios de microdiluição em caldo para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM); além de ação antimicrobiana sobre biofilme de *C. albicans* por meio de contagem do número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Foi avaliado também o potencial irritativo *ex vivo* das soluções pelo teste de membrana córneoalantóide de ovo de galinha e o potencial antioxidante das soluções, por meio do método de redução do ferro (FRAP). Os dados de UFCs e ORAC foram submetidos à ANOVA e ao teste de Tukey ($p < 0,05$) e para os resultados do teste FRAP, os dados foram não paramétricos, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste Dwass-Steel-Critchlow-Fligner. Os resultados dos testes microbiológicos demonstraram que o óleo essencial de citronela associado ao CAPE apresentou ótima atividade antibiofilme e antifúngica. As soluções de CAPE isolada e associada à citronela apresentaram maior atividade antioxidante em relação às demais ($p \leq 0,05$). Maioria das soluções isoladas ou associadas não foram capazes de induzir potencial irritativo para a membrana corioalantoide (CAM). Com base nos resultados deste estudo, concluiu-se que as soluções de citronela e CAPE, associadas ou não, apresentaram ação antifúngica e antibiofilme, em diferentes concentrações, além de terem demonstrado atividade antioxidantes na presença do CAPE, não sendo irritantes à membrana CAM. Ficou evidente o sinergismo das soluções de CAPE e citronela neste estudo.

Palavras-chave: *Cymbopogon nardus*. *Candidíase Oral*. *Candida albicans*. Biofilmes.

ROLIM, P.A.S. Antifungal, antioxidante and irritating potential of citronela oil (*Cymbopogon nardus*) associated associated with caffeic acid phenethyl ester (CAPE). 2022. 70f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2022.

ABSTRACT

The present study aimed to analyze the antifungal, antioxidant and irritating potential of citronella oil associated or not with CAPE for topical treatment of oral candidiasis. As a methodology, an in vitro study of the antifungal action of solutions based on citronella oil associated or not with CAPE was carried out in planktonic culture of a reference strain *C. albicans* (ATCC 10231) by means of microdilution assays in broth to obtain minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (CFM); in addition to antimicrobial action on *C. albicans* biofilms by counting the number of colony forming units (CFU/mL). The ex vivo irritative potential of the solutions was also evaluated by the hen egg chorio-allantoic membrane test and the antioxidant potential of the solutions by the iron reduction method (FRAP). CFUs and ORAC data were submitted to ANOVA and Tukey's test ($p < 0.05$) and for the FRAP test results, the data were non-parametric, using the Kruskal-Wallis test, followed by the Dwass- Steel-Critchlow-Fligner. The results of the microbiological tests showed that the citronella essential oil associated with CAPE had excellent antibiofilm and antifungal activity. The CAPE solutions isolated and associated with citronella showed higher antioxidant activity in relation to the others ($p \leq 0.05$). The isolated or associated solutions were not able to induce irritative potential for the chorioallantoic membrane. Based on the results of this study, it was concluded that citronella and CAPE solutions, associated or not, showed antifungal and antibiofilm action at different concentrations, in addition to demonstrating antioxidant activity in the presence of CAPE, not being irritating to the CAM membrane. The synergism of CAPE and citronella solutions was evident in this study.

Keywords: *Cymbopogon nardus*. Oral Candidosis. *Candida albicans*. Biofilms.

Lista de Figuras

Figura 1. Esquema para abertura do ovo de galinha e exposição da CAM.

Figura 2. Reação do reagente FRAP com o antioxidante em análise.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos irritativos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência.

Tabela 2. Média dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das soluções

Tabela 3. Grupos experimentais e respectivos ativos

Tabela 4. Valores de CIM/CFM para a emulsão de citronela nas cepas de *Candida* testadas, no tempo de 24 h e 48 h.

Tabela 5. Valores de CIM/CFM para o CAPE na cepa de *C. albicans* ATCC 10231 testada, no tempo de 24 h e 48 h.

Tabela 6. Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos irritativos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência, para as diferentes soluções.

Tabela 7. Tabela de Média de Graduação e Classificação final dos grupos do teste HET-CAM.

Tabela 8. Exemplo de pesagens dos volumes de CAPE 0,15 mg/ml.

Tabela 9. Diferença estatística analisada pelo teste de Kruskal-Wallis, para o ensaio FRAP.

Tabela 10. Pesagens de cada volume analisado das amostras.

Tabela 11. Pesagens dos volumes das amostras.

Tabela 12. ANOVA para os dados de redução do radical peroxila.

Lista de Gráficos

Gráfico 1. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos isolados, no tempo de 1 minuto.

Gráfico 2. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos combinados, no tempo de 1 minuto.

Gráfico 3. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos isolados, no tempo de 6 horas.

Gráfico 4. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos combinados, no tempo de 6 horas.

Gráfico 5. Gráfico da curva analítica do Fe^{+2} , relacionando a número de mols de Fe^{+2} e absorvância quando submetido ao ensaio FRAP.

Gráfico 6. Gráfico em coluna para os resultados das amostras analisadas.

Gráfico 7. Gráficos das análises das amostras.

Gráfico 8. Fluorescência versus tempo para as análises das amostras.

Gráfico 9. Massas relativas em nmol trolox/mg dos produtos analisados.

Gráfico 10. Gráfico de comparação das amostras.

Lista de Quadros

Quadro 1 – Grupos experimentais, respectivas concentrações e protocolos de tratamentos realizados nos biofilmes

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	145
2. MATERIAIS E MÉTODOS	177
2.1 Preparo das soluções contendo óleo de citronela e éster fenetílico do ácido cafeico (CAPE).....	177
2.1.3 Solução contendo CAPE.....	18
2.2 Ensaio de microdiluição em caldo para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)	18
2.2.1. Preparo das soluções utilizadas nos ensaios de biofilmes	19
2.3 Ensaio de biofilme	211
2.3.1 Cepa, condição de crescimento formação do biofilme	211
2.3.2 Tratamento dos biofilmes com as soluções.....	211
2.3.3 Método de análise da ação antibiofilme das soluções.....	222
2.4 Estudo <i>ex vivo</i> do potencial de irritação das soluções: teste de membrana córneo-alantóide de ovo de galinha	222
2.4.1 Soluções utilizadas para o ensaio de <i>ex vivo</i> do potencial de irritação.....	244
2.5 Método de análise do potencial antioxidante das soluções.....	255
2.5.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	255
2.5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical estável DPPH.....	256
2.5.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método da ação redutora sobre radicais peroxila (ORAC).....	257
2.6 Forma de análise dos resultados.....	277
3. RESULTADOS.....	28
3.1 Resultados do ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).....	28
3.2 Resultados dos ensaios de biofilme.....	29
3.3 Resultados do potencial de irritação ocular: teste de membrana córneo-alantóide de ovo de galinha	333
3.4 Método de análise do potencial antioxidante das soluções.....	355
3.4.1. Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)	355
3.4.2. Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical estável DPPH	357
3.4.3. Determinação da atividade antioxidante pelo método de ação redutora sobre radicais peroxila (ORAC).....	40
4. DISCUSSÃO.....	433
5. CONCLUSÕES.....	500
Referências.....	511
ANEXOS	58

INTRODUÇÃO

As infecções causadas por fungos são consideradas como uma das ameaças mais significativas à saúde humana. Os fungos são organismos eucarióticos que fazem parte da flora comensal normal humana, eles obtêm benefícios sem causar prejuízos ao hospedeiro. Em humanos, os fungos são tipicamente encontrados na mucosa oral, vaginal e gastrointestinal ou residentes na pele e no epitélio respiratório. Quando ocorrem alterações homeostáticas em um indivíduo, alguns organismos comensais podem apresentar-se patogênicos¹. *Candida* spp. é um dos fungos patogênicos mais frequentes em seres humanos, causando doenças que variam de infecções superficiais das mucosas a infecções sistêmicas disseminadas, que muitas vezes são fatais². Entretanto, raramente é capaz de provocar infecções graves em indivíduos imunocompetentes.

Existem muitas espécies de *Candida* spp. que causam doenças, embora aproximadamente 90% das doenças invasivas sejam causadas pelos cinco patógenos mais comuns, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*³⁻²⁻⁴. Uma situação de parasitismo ocorre quando existe um desequilíbrio entre o hospedeiro e o fungo, originando assim a candidíase oral⁵. Esta espécie de candida faz parte da flora oral normal em cerca de 30 a 50% da população². De acordo com a resposta a uma alteração do ambiente, *Candida* spp. pode passar de comensal benigno a causadora de doença⁶. A espécie principal e mais virulenta associada às infecções orais em humanos é a espécie *C. albicans*, correspondendo a aproximadamente 80% de todos os microrganismos isolados das lesões orais⁷. Uma característica da sua patogenicidade é a capacidade de crescer em formas de levedura, pseudohifas e hifas. A forma de hifas tem um papel importante como causador de doença por invadir as células epiteliais, causando danos nos tecidos¹⁻², proporcionando uma proteção contra a ação do fluxo salivar.

A patogênese de infecções fúngicas é baseada na interação entre o mecanismo homeostático do hospedeiro e a patogenicidade da *Candida* spp. O risco de infecção está aumentado nos pacientes imunocomprometidos ou sujeitos a imunossupressão adquirida ou terapêutica (infecção por HIV, fármacos citotóxicos, corticosteróides), endocrinopatias (diabetes mellitus, hipoparatiroidismo, insuficiência adrenal, etc), deficiências nutricionais, dieta com alto consumo de hidratos de carbono, uso

prolongado de agentes antibacterianos de amplo espectro, alterações quantitativas e qualitativas do fluxo salivar (induzido por fármacos, radioterapia, síndrome de Sjögren), higiene oral deficiente, uso de próteses dentárias, idade avançada e fumantes¹.

Os fatores predisponentes para a candidíase oral são, então, as doenças sistêmicas, a deficiência imunitária, a redução do fluxo salivar, a utilização de antibióticos de largo espectro, o uso de próteses dentárias durante a noite de forma continuada, o fumo e a má higiene oral e das próteses dentárias⁵⁻⁹. *C. albicans* é a espécie fúngica mais comumente associada à estomatite protética, sendo responsável por mais de 70% dos casos de infecção¹⁰⁻¹¹⁻¹². Alguns estudos também detectaram a presença de *Candida* spp. em sítios de periimplantites¹³.

O tratamento clínico de infecções por *Candida* spp. é rotineiramente realizado com polienos, derivados de azóis, alilaminas, tiocarbamatos, luoropirimidinas e equinocandinas. No entanto, essas drogas são responsáveis por efeitos colaterais indesejáveis e toxicidade¹⁴. Além disso, a resistência a estes antifúngicos de uso mais convencional entre as cepas clínicas tem sido amplamente descrita¹⁵⁻¹⁶⁻¹⁷. Assim, a fitoterapia, sendo de baixo custo e fácil utilização, destaca-se como alternativa em potencial a ser pesquisada, dada a escassez de estudos em Odontologia.

A planta conhecida como citronela (*Cymbopogon nardus*) é utilizada para a extração de óleo essencial, muito utilizado como repelente de insetos, tendo como principais componentes químicos, o citronelal, o citronelol e o nerol, que são antissépticos, daí seu extenso uso em sabões e desinfetantes domésticos¹⁸⁻¹⁹⁻²⁰.

Estudos mostram sua efetividade tanto em uso isolado quanto sinergicamente, com uma boa eficácia antimicrobiana¹⁸⁻²¹⁻²² e bons resultados de citotoxicidade em certas concentrações²⁰. Estudos também comprovam seu uso como agente desinfetante de próteses buco-maxilo-faciais²³. Nesse sentido, a citronela é considerada como uma planta de ação antibacteriana e antifúngica potencial, abrindo novas perspectivas de controle de infecção humana.

Outro composto extraído da natureza com atividades biológicas, incluindo efeitos antibacterianos, antivirais, antioxidantes, anti-inflamatórios, imunomodulatórios e anticâncer é o éster fenílico do ácido cafeico (CAPE), um dos principais componentes ativos da própolis²⁴⁻²⁵. Este composto possui uma potente atividade anti-inflamatória e antioxidante²⁶⁻²⁷⁻²⁸⁻²⁹. Além disso, o CAPE acelera a cicatrização de

feridas, reduz a osteoclastogênese e diminui a destruição tecidual causada pelo estresse oxidativo³⁰⁻³¹⁻³² e também estimula a cicatrização óssea³³⁻³⁴⁻³⁵.

Com base nestas informações, considerando a necessidade de se obter alta efetividade sem alterar negativamente as microfloras locais, com baixos efeitos adversos e com custos acessíveis, o presente estudo teve como objetivo analisar o efeito antifúngico, antioxidante e o potencial irritativo do óleo de citronela associado ou não ao CAPE para tratamento tópico de candidíase oral. As hipóteses deste estudo foram as de que o óleo de citronela isolado ou associado ao CAPE apresentaria efeito antifúngico e inibiria o crescimento da espécie *Candida albicans*, não apresentaria potencial irritativo danoso e apresentaria potencial antioxidante.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Preparo das soluções contendo óleo de citronela e éster fenílico do ácido cafeico (CAPE)

2.1.1 Preparo da emulsão de goma xantana pura

0,5 g de goma xantana malha 200 foi dispersa em 100 ml de água destilada misturados em um agitador magnético microcontrolado (Tecnal, Piracicaba, São Paulo). Após a emulsão ficar homogênea, esta foi dispensada num tubo falcon de 50 mL (Kasvi Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, Brasil). Esta solução foi mantida em repouso por 16 h em temperatura ambiente, para posteriormente ser esterilizada em autoclave (Prismatec Equipamentos, Itu, São Paulo). Por fim, a solução foi mantida em geladeira e antes do uso da mesma, esta foi retirada, permanecendo 30 minutos em temperatura ambiente.

2.1.2 Emulsão contendo óleo essencial de citronela

As emulsões de citronela foram diluídas em goma xantana. Para o preparo da emulsão, foi feito o resfriamento da solução contendo goma xantana, e adicionado óleo essencial (OE) de citronela a fim de obter-se uma concentração final de 8 mg/mL de OE, a densidade do óleo puro era de 0,88 g/mL, de acordo com o laudo farmacêutico (ANEXO A). A mistura foi dispersa em dispersor mecânico (IKA®-Werke GmbH & CO. KG), 2000 rpm por 30min em temperatura ambiente. A emulsão final foi

armazenada em tubos falcons (Kasvi Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, Brasil) de 50 mL, envoltos por papel alumínio a 4 °C.

Laudo:

0,88 g/mL de citronela

880 mg.V1 = 8 mg .100 mL

V1 = 0,909 mL (909 microlitros de óleo em 100 mL de goma)

Goma xantana = 8 mg/mL de óleo de citronela

Esta concentração do óleo de citronela foi utilizada no ensaio de microdiluição para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

2.1.3 Solução contendo CAPE

Primeiramente, foi preparada uma solução de estoque contendo CAPE puro, diluído em DMSO (Ciruvix Comercio Ltda) na concentração de 0,5 mg/mL. Para isso, 0,5 mg de CAPE foi diluído em 1 mL de DMSO. Esta concentração de CAPE foi utilizada no ensaio de microdiluição para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM).

2.2 Ensaio de microdiluição em caldo para obtenção da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Inicialmente, curvas de crescimento foram realizadas para a espécie de *C. albicans* (ATCC 10231 e SC5314) com a finalidade de identificar o número de horas necessárias para esta atingir sua fase de maior multiplicação celular (fase log ou exponencial). Os ensaios para obtenção da CIM para os compostos foram realizados pelo método de microdiluição usando microplacas de 96 poços estéreis (Kasvi Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, Brasil), baseados nas normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI:M27-2A) com modificações (Mor et al., 1994). Culturas das espécies de *C. albicans*, previamente reativadas em meio de cultura específico, foram repicadas em meio caldo RPMI-1640 por 24 h em condições de aerobiose, a 37 °C. Em seguida, após as culturas atingirem a metade da fase logarítmica, as células foram separadas por centrifugação a 7000 xg por 10 minutos a

4 °C. Estas foram lavadas e suspendidas em tampão fosfato de sódio – PB (10 mM, pH. 6,8). O número de células foi contado utilizando câmara de Neubauer (HBG HBG Henneberg-Sander GmbH, Gießen, Germany). Em seguida, o número de células foi ajustado utilizando-se RPMI-1640 caldo 2x concentrado para obtenção de 10^5 células/mL. A emulsão contendo goma xantana + OE de citronela foi diluída seriadamente a uma concentração inicial de 4mg/mL em meio RPMI 1640 contendo MOPS, pH 7,0. A partir dessa concentração foram realizadas as demais diluições seriadas (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL). O mesmo foi realizado para a solução contendo CAPE, diluído seriadamente a partir de uma concentração inicial de 0,5mg/mL (0,25, 0,125, 0,0625, 0,03125, 0,0156, 0,0078, 0,0036 mg/mL). Os ensaios foram realizados em placas de microtitulação (Kasvi Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, Brasil) onde o volume final em cada poço foi de 195 μ L (incluindo a solução e o meio RPMI 1640). Posteriormente foi adicionado um volume total de 5 μ L da solução estoque de células (1×10^5 células/mL em meio RPMI 1640) em cada poço. As placas foram incubadas a 37° C por 24-48 h. A CIM foi determinada visualmente onde a ausência de crescimento indicou a menor concentração da emulsão capaz de inibir o crescimento de cada cepa de *C. albicans* (ATCC10231 ou SC5314). O valor de CFM foi determinado pelo plaqueamento de 5 μ L de células provenientes do ensaio de MIC na superfície de placas de petri (Kasvi Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, Brasil) contendo ágar Sabouraud dextrose, em triplicata. Após, as placas foram incubadas a 30° C por 24 h. Para os ensaios subsequentes de biofilme, os compostos foram formulados na concentração equivalente a 10x a CFM²⁰. Para os ensaios subsequentes de biofilme, a solução de citronela e de CAPE isoladamente foram formuladas nas seguintes concentrações: 2,5x, 5x e 10x a CFM²⁰.

2.2.1. Preparo das soluções utilizadas nos ensaios de biofilmes

Três emulsões puras de citronela foram formuladas em goma xantana, na concentração de 1,25 mg/mL, 2,5 mg/mL e 5 mg/mL, sendo equivalentes a 2,5x, 5x e 10x o CFM. Em seguida, foram preparadas emulsões contendo CAPE, diluídas em goma xantana, a partir da solução estoque, nas concentrações de 0,31 mg/mL, 0,15 mg/mL e 0,07 mg/mL, sendo equivalentes a 2,5x, 5x e 10x o CFM, de acordo com os resultados dos ensaios de microdiluição (Anexo B).

Além destas soluções puras, foi preparada também uma solução contendo a associação do óleo essencial de citronela e CAPE. Para isso, 990 uL de emulsão de citronela em goma xantana a 5 mg/mL (10x CFM) foram acrescentados em 10 uL de CAPE a 31 mg/mL (solução de estoque – CAPE puro), obtendo-se uma solução final com concentração de 0,31mg/mL de CAPE (10x CFM) associado ao óleo essencial de citronela a 5 mg/mL. E esta solução de 10x deu origem às outras quatro diluições: CAPE 0,15 mg/mL + 2,5 mg/mL de OE; CAPE 0,07 mg/mL + 1,25 mg/mL de OE; CAPE 0,038 mg/mL + CITRO 0,625 mg/mL. Para os grupos controles das soluções, foram utilizados goma xantana pura e para o controle do CAPE, foi feita a diluição de 990 uL de xantana em 10 uL de DMSO. A clorexidina 0,12% foi usada como controle positivo, bem como biofilme em meio de cultura ágar Sabouraud sem agentes antimicrobianos para avaliar a viabilidade dos fungos testados, sem fornecer nutrientes ou agentes tóxicos para eles. Os grupos experimentais, concentrações e tipos de tratamento realizados nos biofilmes estão representados no quadro abaixo.

Quadro 1 - Grupos experimentais, respectivas concentrações e tratamentos realizados nos biofilmes

GRUPOS DAS SOLUÇÕES TESTADAS	PROTOCOLOS
CONTROLE NEGATIVO	<p>2H DE PRÉ ADESAO</p> <p>1 MIN DE TRATAMENTO</p> <p>e</p> <p>24 H DE ADESAO</p> <p>6H DE TRATAMENTO</p>
CONTROLE POSITIVO (CLOREXIDINA 0,12%)	
CONTROLE DE GOMA XANTANA	
CONTROLE DO CAPE (GOMA XANTANA+DMSO)	
CITRO 5 mg/mL (10x CFM)	
CITRO 2,5 mg/mL (5x CFM)	
CITRO 1,25 mg/ml (2,5x CFM)	
CAPE 0,31 mg/mL (10x CFM)	
CAPE 0,15 mg/mL (5x CFM)	
CAPE 0,0775 mg/mL (2,5x CFM)	
CAPE (0,31 mg/mL) + CITRO (5 mg/mL)	
CAPE (0,15 mg/mL) + CITRO (2,5 mg/mL)	
CAPE (0,0775 mg/mL) + CITRO (1,25 mg/mL)	
CAPE (0,038 mg/mL) + CITRO (0,625 mg/mL)	
CAPE (0,019 mg/mL) + CITRO (0,312 mg/mL)	

2.3 Ensaio de biofilme

2.3.1 Cepa, condição de crescimento formação do biofilme

Para obtenção da cultura microbiana, a espécie de *C. albicans* (ATCC 10231) foi reativada a partir da amostra padrão congelada em freezer -80° C e cultivada em placa de Sabouraud Dextrose Ágar (Difco Laboratories Ltda). A placa foi incubada por 24 h a 37 ° C em condições de aerobiose. A seguir, foi repicada em caldo Sabouraud (Difco) e incubada por 24 h antes do dia do experimento. Primeiramente, foi realizada a pré-adesão com 200 µL de saliva artificial nos poços das placas de poliestireno (96 poços) pelo tempo de 2h. Em seguida, foi feita a remoção da saliva dos mesmos e feito o preenchimento com 180 µL do caldo Sabouraud (Difco), e 20 µL da cultura microbiana ajustada na D.O. de 0,3, diluída 10x (aproximadamente 10⁵ células/mL). O tempo de incubação da cultura foi determinado de acordo com o protocolo de tratamento, sendo estabelecido dois protocolos no presente estudo. O primeiro foi realizado utilizando-se o tempo de 2 h, simulando a pré-adesão de biofilme. Já o segundo foi realizado utilizando-se o tempo de 24 h de formação de biofilme. Foi utilizada para os ensaios, a temperatura de 37 °C, em condições de aerobiose, para formação do biofilme sobre a superfície dos poços, sob agitação a 120 rpm, em mesa agitadora (Cienlab), de acordo com o tempo de estabelecido.

2.3.2 Tratamento dos biofilmes com as soluções

Os poços das placas contendo o biofilme de *C. albicans* foram submetidos à ação das soluções de óleo de citronela (com ou sem CAPE e associações), por diferentes tempos de ação (1 minuto e 6 horas), simulando duas diferentes situações clínicas de tratamento: bochecho de 1 minuto e uso tópico de pomada ou gel mucoadesivo com ação de 6 horas de tratamento. Após o período de formação de biofilme, os poços foram lavados com 200 µL de solução salina estéril (NaCl a 0,9%), para subsequente adição das soluções de OE de citronela associado ou não ao CAPE, em diferentes tempos de ação. Para o protocolo de pré-adesão de biofilme por 2h, as soluções contendo os respectivos tratamentos foram inseridas nos poços (200 µL de cada solução) pelo tempo de 1 minuto, simulando a condição clínica de bochecho. Já para o protocolo de formação de biofilme pelo tempo de 24 h, as soluções ficaram em contato com os poços pelo tempo de 6 horas, simulando a condição clínica de uso de

pomada ou gel mucoadesivo. Ambos os protocolos foram conduzidos sob agitação utilizando mesa agitadora (Cienlab) orbital a 120-130 rpm, na temperatura de 37°C pelo tempo determinado, de acordo com o quadro 1. Em seguida, as soluções de tratamento foram removidas de cada poço, e 200 µL de solução salina foi inserida para possibilitar a raspagem do biofilme (10x) dos poços. Este conteúdo foi inserido em microtubos do tipo eppendorf (Kasvi Produtos para Laboratório, São José dos Pinhais, Brasil), e foram levados para centrifugação (8000 rpm – 5 minutos). Em seguida, foi feita a remoção do sobrenadante, e o pellet foi ressuspenso em 1 mL solução salina no eppendorf, e agitado vigorosamente com o auxílio de um vórtex (Phoenix AP 56), seguido do plaqueamento para contagem de UFC/mL. Os experimentos foram realizados em dois ensaios independentes ambos em triplicatas.

2.3.3 Método de análise da ação antibiofilme das soluções

O efeito antibiofilme foi avaliado por contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFCs). Suspensões de biofilme (20 µL de cultura para 180 µL de solução salina) foram vigorosamente agitadas durante 90s e diluições decimais seriadas (em solução salina) foram plaqueadas em Ágar Sabouraud Dextrose (ASD; Difco) para contagem de colônias de *C. albicans*. Após 24 horas de incubação das placas em estufa (Lutech, São José do Rio Preto), o número de UFCs/mL foi contado manualmente.

2.4. Estudo *ex vivo* do potencial de irritação das soluções: teste de membrana cório-alantóide de ovo de galinha

O potencial de irritação das soluções de óleo de citronela (com ou sem CAPE) foi determinado por meio do ensaio HET-CAM³⁷⁻³⁸⁻³⁹⁻⁴⁰. A metodologia seguiu o protocolo atualmente recomendado pela “*Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods – ICCVAM*”, onde se avaliou a reação dos vasos sanguíneos e as lesões na membrana provocadas pelas soluções de acordo com a velocidade em que ocorre o dano, correlacionando-se com o potencial do produto em danificar mucosas *in vivo*³⁹.

Ovos de galinhas White Leghorn frescos (com no máximo 7 dias), fertilizados, com peso entre 50-60 g foram desinfetados com etanol 70⁴¹ e incubados a 38,3 ± 0,2°C e 58 ± 2% de umidade relativa. Os mesmos foram rotacionados manualmente

5 vezes ao dia e no oitavo dia e foram selecionados os que não apresentarem alterações detectadas através de uma lâmpada fria. A partir daí os ovos selecionados não foram mais rotacionados e no nono dia os ovos viáveis foram submetidos aos seguintes procedimentos: I) remoção da casca ao redor da câmara de ar com uma broca esférica, até a exposição da membrana da casca (Figura 1); II) hidratação da membrana da casca com 0,9% de NaCl e remoção cuidadosa com uma pinça para exposição da CAM; III) aplicação sobre a CAM de 0,3 ml das soluções teste. Seguindo-se o protocolo recomendado pela ICCVAM foi utilizado o método de análise S(A), que determina escores específicos das reações de hemorragia, hiperemia e coagulação para intervalos de tempos fixos (Menos de 30 s, Entre 30 e 60 s e Entre 60 e 300 s) (Tabela 1). O valor médio da soma dos escores de três testes independentes ($n=3$)⁴² foi utilizado para avaliação através de um esquema de classificação, no qual as pontuações foram classificadas em intervalos numéricos: 0,0-0,9 (não irritante), 1,0-4,9 (irritante leve), 5,0-8,9 (irritante moderada) e 9,0-21,0 (irritante severo). NaOH a 0,1 N foi o controle positivo, que deve apresentar escore de irritação entre 10 e 21. NaCl a 0,9% foi o controle negativo e não deverá induzir irritação.

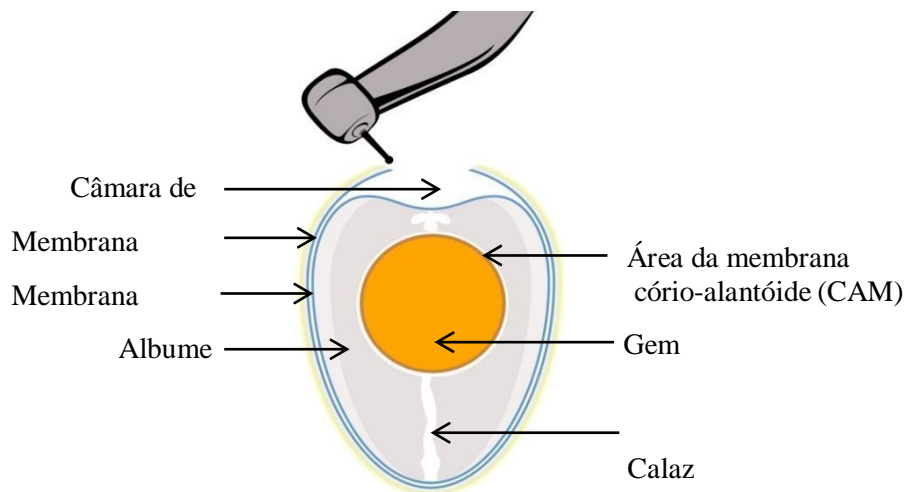


Figura 1. Esquema para abertura do ovo de galinha e exposição da CAM.

Tabela 1. Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos irritativos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência

Efeito	Escore		
	Menos de 30 s	Entre 30 e 60 s	Entre 60 e 300 s
Hiperemia	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Tabela 2. Média dos fenômenos irritantes e a classificação final do grau de irritação das soluções

Média dos valores de graduação dos fenômenos irritantes	Classificação final do grau de irritação das soluções
0,0 - 0,99	Não irritante (NI)
1,0 - 4,99	Irritante leve (IL)
5,0 - 8,99	Irritante moderado (IM)
9,0 - 21	Irritante severo (IS)

2.4.1 Soluções utilizadas para o ensaio de *ex vivo* do potencial de irritação

Apenas as soluções menos concentradas que inibiram em 100% o desenvolvimento dos biofilmes foram utilizadas para este ensaio. Assim, de acordo com os resultados de UFCs/mL, os grupos estabelecidos foram os representados na tabela 3.

Tabela 3. Grupos experimentais e respectivos ativos

Grupos experimentais	
GI -	Clorexidina 0,12%
GII-	Controle de Goma Xantana
GIII-	Controle do CAPE
GIV-	Solução de CITRO 1,25 mg/mL
GV-	Solução de CAPE 0,038 mg/mL + CITRO 0,625 mg/mL
GVI-	Solução de CITRO 2,5 mg/mL
GVII-	Solução de CAPE 0,0775 mg/mL + CITRO 1,25 mg/mL
GVIII-	CAPE 0,15 mg/mL
GIX-	Controle Positivo NaOH
GX-	Controle Negativo Salina

2.5 Método de análise do potencial antioxidante das soluções

2.5.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

O ensaio do FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), poder antioxidante de redução de ferro, estima a capacidade dos antioxidantes em reduzir o complexo de Ferro Férrico Tripiridiltriazina (Fe^{3+} -TPTZ) ao complexo de Ferro Ferroso Tripiridiltriazina (Fe^{2+} -TPTZ) em pH 3,6, formando uma solução de coloração azul intensa com absorção máxima de 593 nm, sendo possível medir o efeito antioxidante monitorando a formação do complexo Fe^{2+} -TPTZ com um espectrofotômetro (Eon Microplate). O reagente TPTZ foi preparado usando uma solução de TPTZ em solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, a solução de trabalho foi preparada misturando tampão acetato pH 3,6, a solução TPTZ e a solução $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Foi pipetado em microplaca de 96 poços, 290 μL da solução de FRAP e 10 μL das soluções de estudo e o padrão trolox, em diferentes concentrações. Em seguida, a placa foi incubada em estufa a 37°C por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 593 nm (Eon Microplate)⁴³.

2.5.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical estável DPPH

A capacidade sequestradora de radicais livres das soluções de óleo de citronela (com ou sem CAPE) foi determinada pelo seu potencial de redução sobre o radical 1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Os resultados são baseados na porcentagem sequestrante do radical DPPH pelas possíveis substâncias antioxidantes de estudo. A substância antioxidante pode doar um átomo de hidrogênio ou transferir um elétron para a molécula de DPPH, que aceita e se torna uma molécula estável formando a forma reduzida DPPH-H. Uma maneira de analisar a comprovação da redução dessa molécula é na observação da cor da solução, que passa de violeta para uma tonalidade de amarelo pálido, essa modificação também diminui a absorbância do radical DPPH, sendo possível realizar uma análise espectrofotométrica com o intuito de determinar a capacidade oxidante do composto em estudo. A reação que acontece está ilustrada na figura 2. As substâncias testadas em diferentes concentrações foram incubadas durante 30 minutos, no escuro, em solução etanólica de DPPH 100 μM (Sigma Aldrich®, St. Louis, MO, USA). A leitura da absorbância foi realizada em comprimento de onda de 515 nm em espectrofotômetro UV-Mini 1240, em relação a um branco constituído de álcool etílico. Os experimentos foram efetuados em triplicata e o percentual de sequestro do radical DPPH foi calculado, tendo como referência o controle (DPPH 100 μM) na ausência das substâncias em estudo:

$$\text{Porcentagem de supressão} = \left[\frac{(\text{absorbância do controle} - \text{absorbância da amostra})}{(\text{absorbância do controle})} \right] \times 100$$

A partir dos valores das porcentagens de supressão foi calculado o EC50 das substâncias em estudo.⁴³

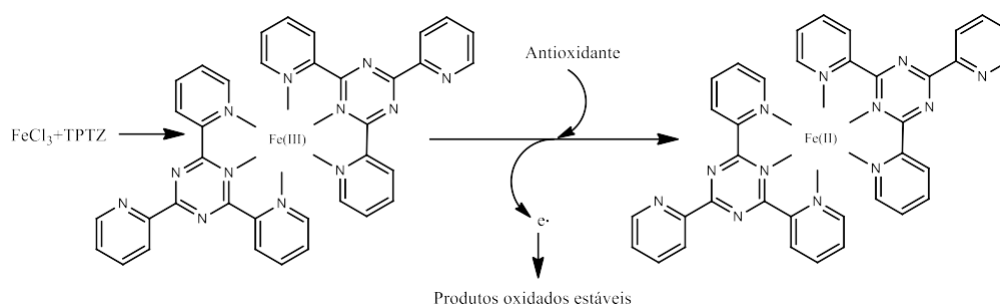


Figura 2. Reação do reagente FRAP com o antioxidante em análise.

2.5.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método da ação redutora sobre radicais peroxila (ORAC)

O ORAC ou *Oxygen Radical Absorbance Capacity*, é um método que verifica a capacidade sequestradora de um antioxidante pela formação de um radical peroxila que é gerado pela reação do 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidroclorato ou AAPH, na temperatura de 37°C com oxigênio atmosférico. O radical gerado reage com uma molécula fluorescente formando um produto não fluorescente. E a inibição do decaimento da fluorescência em função do tempo se correlaciona com a eficiência do antioxidante em estudo. A atividade antioxidante de uma dada substância é determinada através da diferença entre a área da amostra subtraída pela área do branco, medida pelo decaimento da fluorescência com a adição da substância antioxidante no decorrer do tempo. A atividade antioxidante é medida pela diferença da área sob a curva da amostra e da análise do controle, e expressa em equivalência de concentração de um antioxidante de concentração conhecida, como o Trolox.

Este ensaio se baseia no decaimento da fluorescência da piranina quando submetido à oxidação por radicais peroxila. Foi utilizada uma solução 5 mM do composto fluorescente piranina (Sigma-Aldrich®, St. Louis, MO, USA) e 40 mM de AAPH em PBS (pH 7,4) a 37°C na ausência (controle) ou na presença dos compostos de estudo em poços de uma microplaca preta durante 3 horas. Como padrão referência foi utilizado o composto antioxidante padrão Trolox. O volume final da reação foi de 300 µL. O decaimento de fluorescência da piranina foi monitorado utilizando os comprimentos de onda de excitação de 456nm e comprimento de onda de emissão de 512nm em um leitor Spectramax M2 Microplate (Molecular Devices, EUA). A capacidade antioxidante foi avaliada em função do tempo de indução, ou seja, o atraso no decaimento de fluorescência da piranina provocado pela presença dos compostos em estudo⁴⁴.

2.6 Forma de análise dos resultados

Os dados de contagem fúngica (UFCs) obtidos para o ensaio de biofilme foram convertidos em Log₁₀ (UFC/mL). Os mesmos foram analisados quanto a sua homogeneidade (Shapiro Wilk), a fim de determinar se provinham ou não de uma distribuição normal. Como a distribuição dos dados foi paramétrica, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada, seguido do teste de Tukey-Kramer ($\alpha=.05$), utilizando-se o programa IBM SPSS 20.0 (IBM, Armonk, NY, USA).

Para os dados dos testes antioxidantes, os mesmos foram analisados quanto a sua homogeneidade (Shapiro Wilk), a fim de determinar se provinham ou não de uma distribuição normal. Como a distribuição dos dados foi paramétrica para o teste ORAC, a análise de variância (ANOVA) foi aplicada, seguido do teste de Tukey-Kramer ($\alpha=0.05$). Já para os resultados do teste FRAP, os dados foram não paramétricos, sendo utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste Dwass-Steel-Critchlow-Fligner, utilizando-se o programa JAMOVI 2.2.5.

3. RESULTADOS

3.1 Resultados do ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

Os resultados de CIM/CFM para as cepas de *Candida* testadas estão apresentados nas tabelas abaixo. Foi possível observar que, para a emulsão de citronela, os valores de CIM e CFM foram de 0,5 mg/mL, em ambos os tempos testados (24 h e 48 h). Para o CAPE, os valores de CFM encontrados foram de 0,031mg/mL, em ambos os tempos testados (ANEXO B).

Tabela 4. Valores de CIM/CFM para a emulsão de citronela na cepa de *C. albicans* ATCC 10231 testadas, no tempo de 24 h e 48 h.

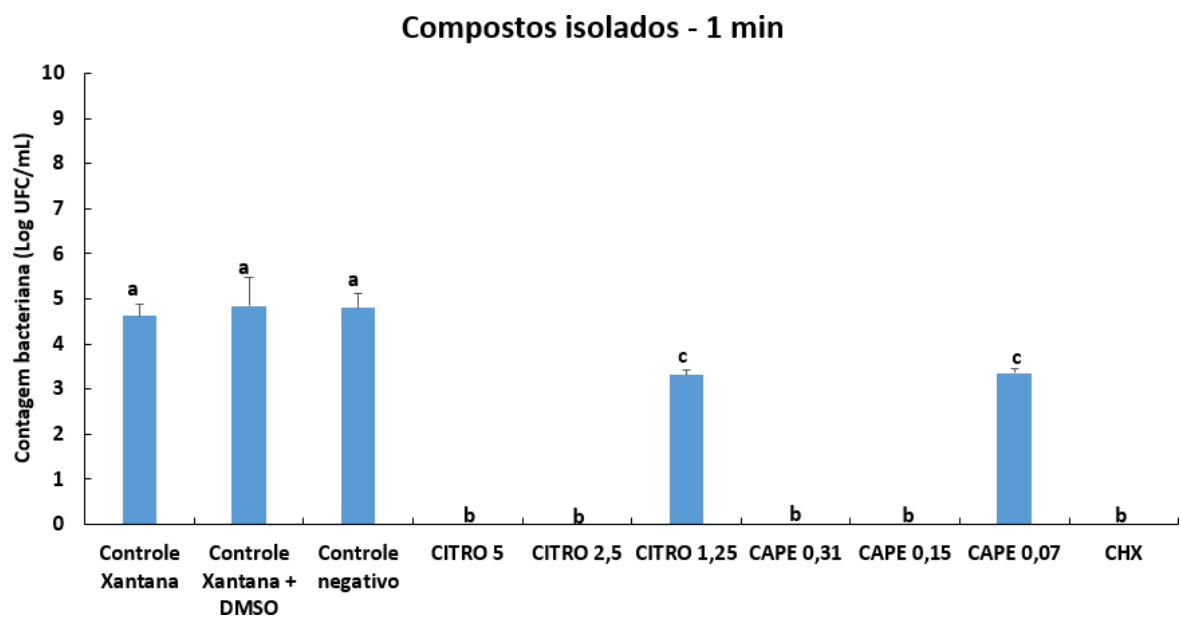
Emulsão de Citronela	CIM	CFM
24 h	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL
48 h	0,25 mg/mL	0,5 mg/mL

Tabela 5. Valores de CIM/CFM para o CAPE na cepa de *C. albicans* ATCC 10231 testada, no tempo de 24 h e 48 h.

CAPE	CIM	CFM
24 h	0,0156 mg/mL	0,031mg/mL
48 h	0,0156 mg/mL	0,031mg/mL

3.2 Resultados dos ensaios de biofilme

Os resultados dos tratamentos dos biofilmes de *C. albicans* ATCC10231 estão apresentados nos gráficos 1, 2, 3 e 4 abaixo, e foram divididos de acordo com o uso das soluções isoladamente ou associadas, nos dois protocolos de utilização (1 min e 6h). Nos gráficos 1 e 2, estão apresentados os dados dos compostos utilizados isoladamente, nos tempos de tratamento de 1 minuto e 6 horas, nas diferentes concentrações testadas. Nos gráficos 3 e 4, estão apresentados os dados do uso dos compostos combinados entre si.

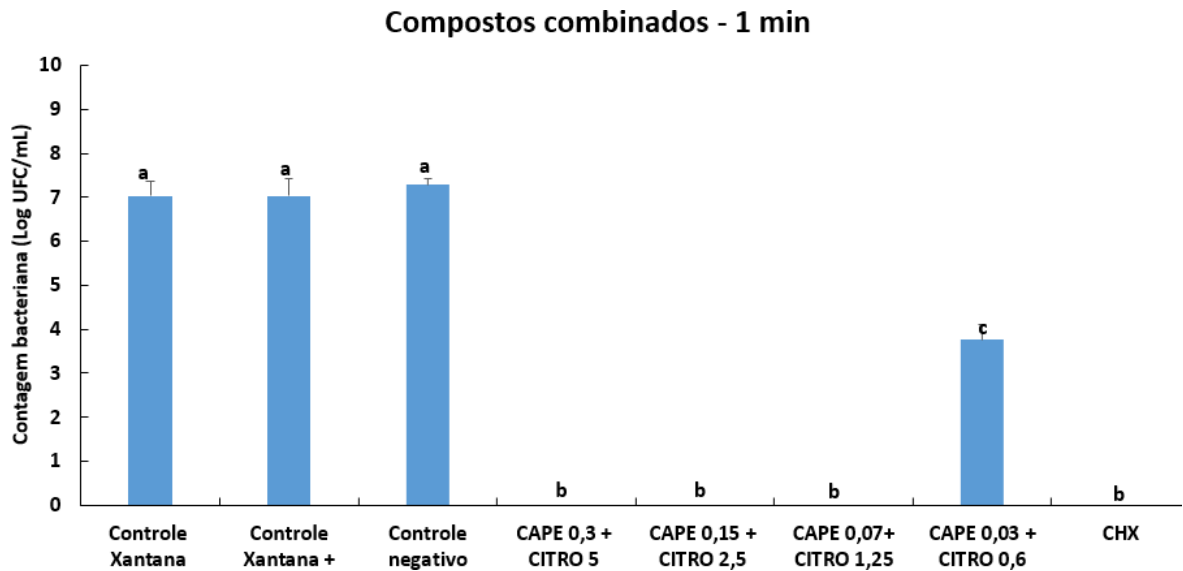


As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$).

Gráfico 1. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos isolados, no tempo de 1 minuto.

No gráfico 1, é possível observar a ação antifúngica dos compostos isolados no tempo de 1 minuto de tratamento, na qual houve diferença estatística significativa entre o controle negativo e todas as concentrações dos compostos avaliados, apresentando redução significativa do crescimento do fungo, bem como para a solução de clorexidina a 0,12% (controle positivo). As soluções de citronela a 1,25 mg/mL e CAPE a 0,07 mg/mL apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas às demais, mas não apresentaram diferença entre si, ambas promoveram redução do valor de Log (UFC/mL), mas não eliminaram totalmente a

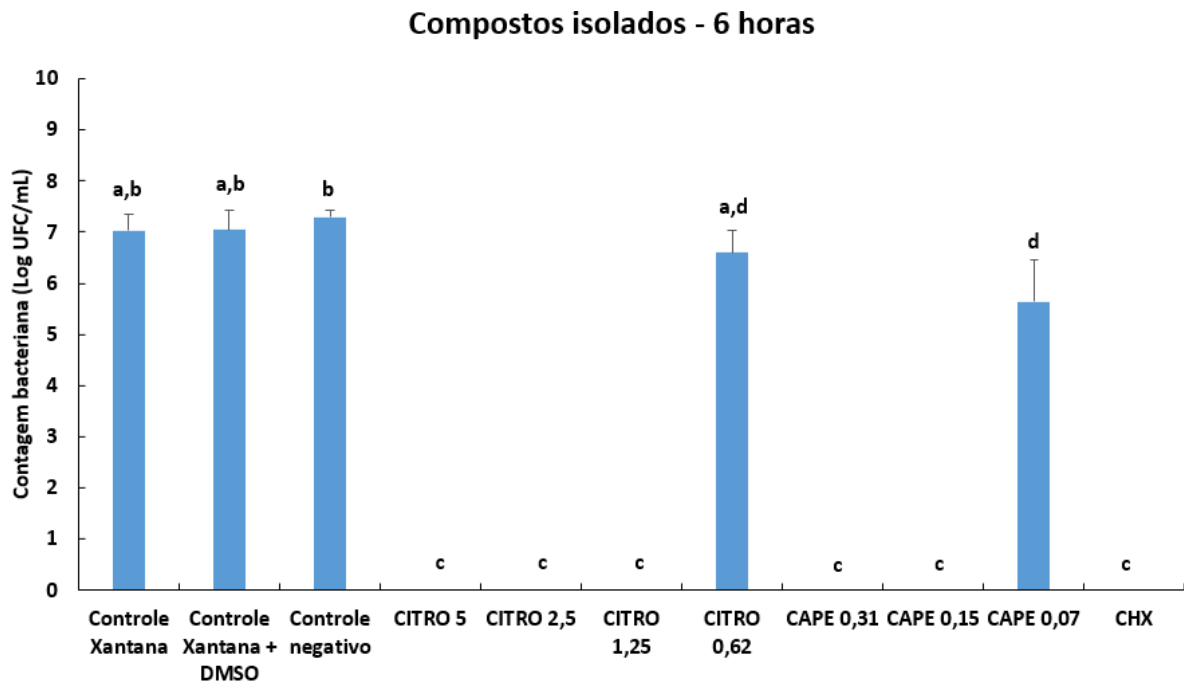
contagem de UFCs. Já com relação aos controles das soluções, nenhum apresentou atividade antifúngica e não apresentaram diferença estatística significativa quando comparado ao controle negativo.



As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$).

Gráfico 2. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos combinados, no tempo de 1 minuto.

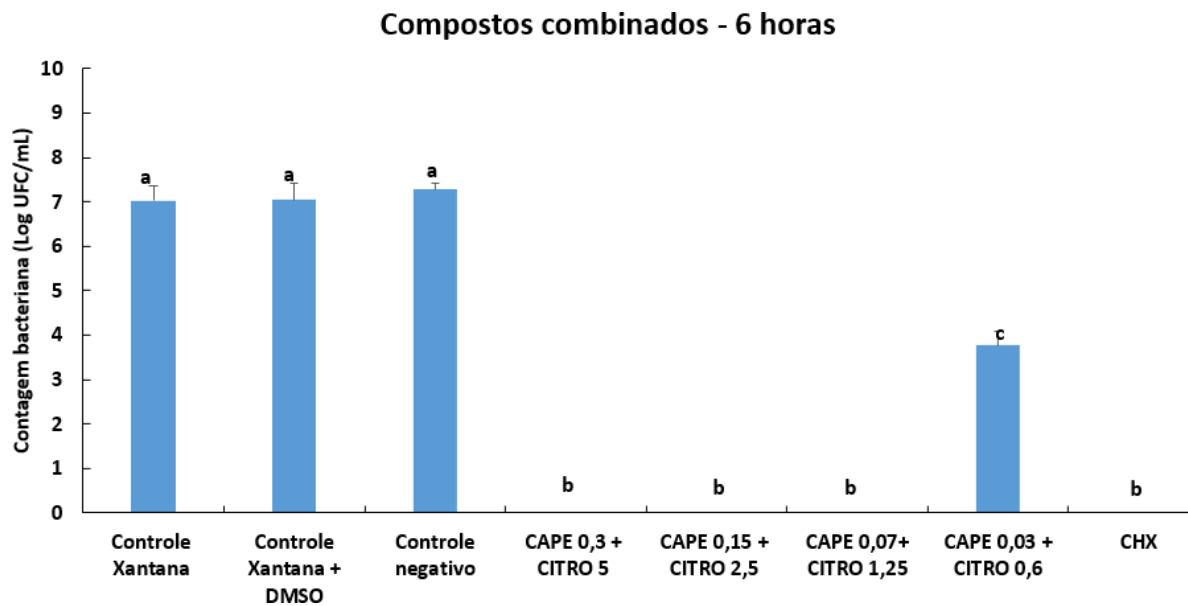
No gráfico 2, é possível observar a ação antifúngica dos compostos combinados no tempo de 1 minuto de tratamento. Houve diferença estatística significativa entre o controle negativo e todas as concentrações dos compostos avaliados, apresentando redução significativa do crescimento do fungo, bem como para a solução de clorexidina a 0,12% (controle positivo). A concentração de CAPE 0,03 mg/mL + CITRO a 0,6 mg/mL apresentou diferença estatística significativa quando comparada às demais concentrações testadas, promovendo redução do valor de Log(UFC/mL), mas não eliminou totalmente a contagem de UFCs. Já em relação ao grupo controle das soluções, nenhum apresentou atividade antifúngica e não apresentaram diferença estatística significativa quando comparados ao controle negativo.



As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$).

Gráfico 3. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos isolados, no tempo de 6 horas.

No gráfico 3, é possível observar a ação antifúngica dos compostos isolados no tempo de 6 horas de tratamento. Houve diferença estatística significativa entre todas as soluções testadas dos compostos isolados, quando comparados ao grupo controle negativo, bem como para a solução de clorexidina a 0,12% (controle positivo). As concentrações das soluções de citronela a 0,62 mg/mL e CAPE a 0,07 mg/mL apresentaram diferença estatística significativa quando comparadas às demais concentrações testadas, mas não diferiram entre si, promovendo redução do valor de Log (UFC/mL), entretanto não eliminaram totalmente a contagem de UFCs. Também é possível notar que não houve diferença estatística significativa entre os controles das soluções quando comparados ao grupo controle negativo.



As letras minúsculas diferentes mostram diferença estatística entre os grupos, segundo os testes de ANOVA e Tukey ($p < 0,05$).

Gráfico 4. Contagem de biofilme de *C. albicans* em Log (UFC/mL), após o tratamento com os compostos combinados, no tempo de 6 horas.

No gráfico 4, é possível observar a ação antifúngica dos compostos combinados no tempo de 6 horas de tratamento. Houve diferença estatística significativa entre todas as concentrações testadas, quando comparados ao grupo controle negativo, bem como para a solução de clorexidina a 0,12% (controle positivo). A concentração de CAPE 0,03 mg/mL + CITRO a 0,6 mg/mL apresentou diferença estatística significativa quando comparada às demais concentrações testadas promovendo redução do valor de Log (UFC/mL), mas não eliminou totalmente a contagem de UFCs. É possível notar que não houve diferença estatística significativa entre os controles das soluções quando comparados ao grupo controle negativo.

3.3 Resultados do potencial de irritação ocular: teste de membrana cório-alantóide de ovo de galinha

A tabela 6 abaixo mostra os resultados do potencial irritativo para as soluções em análise.

Tabela 6. Graduação numérica (1, 3, 5, 7 e 9) dos fenômenos irritativos em função do tempo decorrido (segundos) para sua ocorrência, para as diferentes soluções.

Categoria	Segundos	Clorexidina 0,12%			Controle Xantana			Controle CAPE			CITRO 1,25 mg/ml		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Hiperemia	0 - 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0 - 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	0	0	0	3	0	0	0
Coagulação	0 - 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Categoria	Segundos	CAPE 0,038 mg/mL + Citro 0,625 mg/mL			CITRO 2,5 mg/ml			CAPE 0,0775 mg/mL + CITRO 1,25 mg/mL			CAPE 0,15 mg/mL		
		A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C
Hiperemia	0 - 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0
Hemorragia	0 - 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Coagulação	0 - 30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Categoria	Segundos	Controle Positivo - NaOH			Controle Negativo - Salina		
		A	B	C	A	B	C
Hiperemia	0 - 30	5	5	5	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	0
Hemorragia	0 - 30	7	7	7	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	0
Coagulação	0 - 30	9	9	9	0	0	0
	30 - 60	0	0	0	0	0	0
	60 - 300	0	0	0	0	0	0

Tabela 7. Tabela de Média de Graduação e Classificação final dos grupos do teste HET-CAM.

GRUPOS	Soluções	Média dos valores de graduação dos fenômenos irritantes	Classificação final do grau de irritação das soluções
GI	CHX 0,12%	0,00	NI
GII	Controle de Goma Xantana	0,00	NI
GIII	Controle do CAPE	1,0*	IL
GIV	Solução de CITRO 1,25 mg/mL	0,00	NI
GV	Solução de CAPE 0,038 mg/mL + CITRO 0,625 mg/mL	1,0*	IL
GVI	Solução de CITRO 2,5 mg/mL	0,33	NI
GVII	Solução de CAPE 0,0775 mg/mL + CITRO 1,25 mg/mL	0,33	NI
GVIII	CAPE 0,15 mg/mL	0,00	NI
GIX	Controle Negativo Salina	0,00	NI
GX	Controle Positivo NaOH	21,00	IS

Nota: NI – Não Irritativo; IL – Irritativo Leve. IS – Irritativo Severo

Na tabela 6 foi possível observar que apenas os grupos GIII e GV apresentaram um grau de irritação na categoria de hemorragia, numa graduação numérica 3. Como a classificação final do grau de irritação das soluções é feita pela média da soma de valores obtidos pelos 3 testes por grupo, o grau de irritabilidade foi 1 para estes dois grupos, sendo classificados como irritantes leves (Tabela 7). Os grupos GVI e GVII apresentaram um grau de irritação na categoria de hiperemia, numa graduação numérica 1, dando um grau de irritabilidade de 0,33, sendo classificados como não irritantes. Nos demais grupos foi possível observar que não houve nenhuma reação de hiperemia, hemorragia e/ou coagulação, sendo estas soluções classificadas como não irritantes (Tabela 7). Na tabela 6 ainda, foi possível determinar o grau irritativo dos grupos de controle positivo e controle negativo, sendo que o C- (Salina) não obteve índice de irritabilidade, já o C+ (NaOH) foi classificado como Irritativo Severo, tendo um score de valor 21.

3.4 Resultados das análises do potencial antioxidante das soluções

3.4.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

No ensaio FRAP mediu-se a capacidade do composto em estudo em reduzir íons Fe^{+3} à Fe^{+2} . Os resultados foram expressos em termos de equivalência em Fe^{+2} produzido pela redução de Fe^{+3} por massa do composto em estudo. Assim, inicialmente produziu-se uma curva analítica utilizando Fe^{+2} (FeSO_4) puro como referência (Gráfico 5). A partir da mesma, calcula-se a concentração equivalente das amostras.

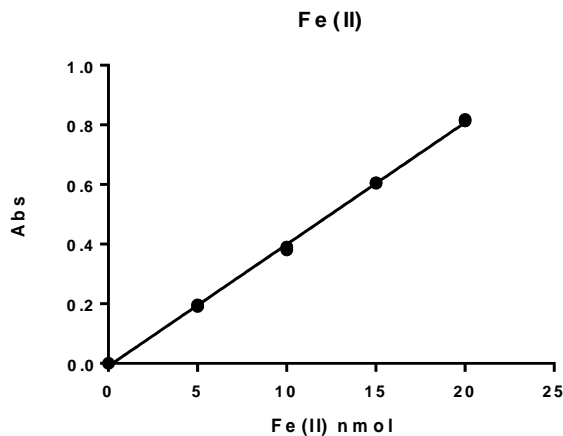


Gráfico 5. Gráfico da curva analítica do Fe^{+2} , relacionando a número de mols de Fe^{+2} e absorbância quando submetido ao ensaio FRAP.

A partir da curva analítica obteve-se a equação da reta (Eq. 2) e aplicando as absorbâncias das amostras à mesma, obteve-se a equivalência em Fe^{+2} produzido.

$$\text{Eq. 2: } \text{Abs} = 0,04084 \text{ nmol Fe(II)} - 0,008933$$

Tabela 8. Exemplo de pesagens dos volumes de CAPE 0,15 mg/ml:

	Pesagens (mg)					Médias
10 μL	9,9	10,7	10,2	9,2	10,2	10,40
20 μL	20,9	19,1	18,9	20,4	19,1	19,68

Exemplo de cálculo:

Correlação com a massa de amostra CAPE 0,15 mg/mL 10 μ L:

10,40 mg – 7,86 nmol de Fe(II)

1 mg – 0,782 nmol/mg de Fe (II)

Correlação com a massa de amostra CAPE 0,15 mg/mL 20 μ L:

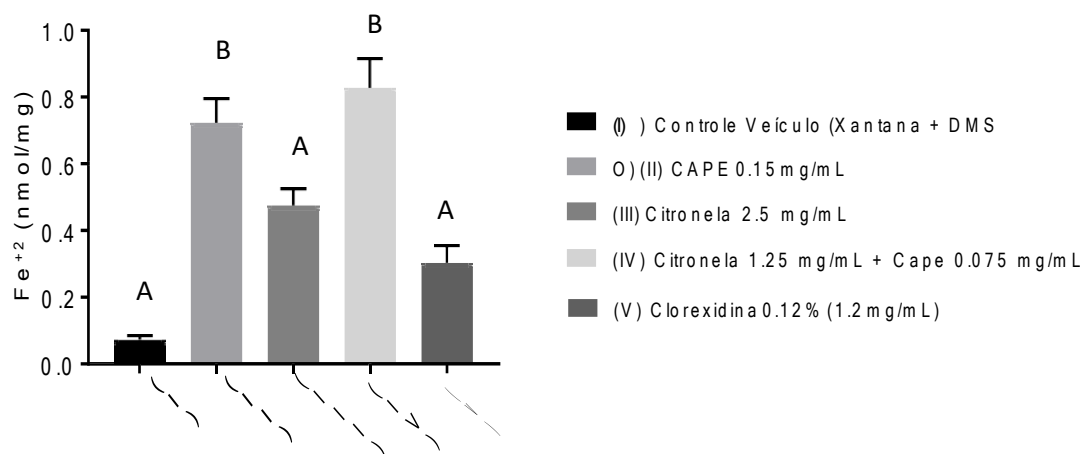
19,68 mg – 14,71 nmol de Fe(II)

1 mg – 0,74 nmol/mg de Fe (II)

. De acordo com a análise estatística de Kruskal-Wallis, foi possível observar que houve diferença estatística entre as soluções, $p < .001$ (Tabela 9). A partir dos resultados obtidos, plotou-se o gráfico para o ensaio de FRAP, com a análise estatística comparativa das soluções testadas ($p \leq .05$).

Tabela 9. Diferença estatística analisada pelo teste de Kruskal-Wallis, para o ensaio FRAP.

Kruskal-Wallis			
	χ^2	df	p
Redução do Fe	27.2	4	< .001



Nota: Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem ao nível de 5% de significância ($p \leq 0.05$) pelo teste de Tukey.

Gráfico 6. Gráfico em coluna para os resultados das amostras analisadas.

Após a análise do nível de absorvância, equivalência das amostras para Fe^{+2} e a pesagem dos volumes das amostras para determinar a massa das mesmas, foi possível criar o gráfico de resultados (Gráfico 6), o qual demonstra que a solução que apresentou a maior capacidade antioxidante foi a da associação da Citronela 1,25 + CAPE 0,0775 mg/mL, sem diferença estatística com a solução de CAPE 0,15 mg/mL isolada. As soluções de citronela 2,5 mg/mL e clorexidina a 0,12%, não obtiveram resultados de capacidade antioxidante satisfatórios, obtendo valores similares estatisticamente ao grupo controle.

3.4.2 Determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do radical estável DPPH

Após a medição das absorvâncias das amostras, calculou-se a atividade sequestradora do radical DPPH que foi expressa em porcentagem.

$$\% \text{ Supressão} = \frac{ABS_c - ABS_a}{ABS_c} \times 100$$

Abs_c = Absorvância do controle

Abs_a = Absorvância da amostra

Exemplo de cálculo utilizando uma absorvância da amostra CAPE 0,15 mg/mL:

$$\% \text{ Supressão} = \frac{0,966 - 0,700}{0,966} \times 100 = 27,54 \%$$

Pesou-se os volumes das amostras para realizar a análise dos gráficos em % de inibição por mg/mL.

Tabela 10. Pesagens de cada volume analisado das amostras.

<i>Volume (μL)</i>	<i>Pesagens (mg)</i>					<i>Médias (mg)</i>
10	10,00	10,90	11,50	14,90	9,70	11,4
20	19,40	22,00	22,20	25,70	19,20	21,7
30	29,00	33,00	33,20	34,20	28,50	31,58
40	38,60	44,30	42,90	42,70	38,80	41,46
50	48,50	55,30	54,20	52,00	48,70	51,74
60	57,90	65,70	64,20	61,50	58,90	61,64
70	67,80	76,50	73,40	71,10	68,40	71,44

Em seguida, correlaciona-se os valores de % de supressão com as massas dos materiais de modo a expressar os resultados em valores de % de supressão por mg/mL dos produtos.

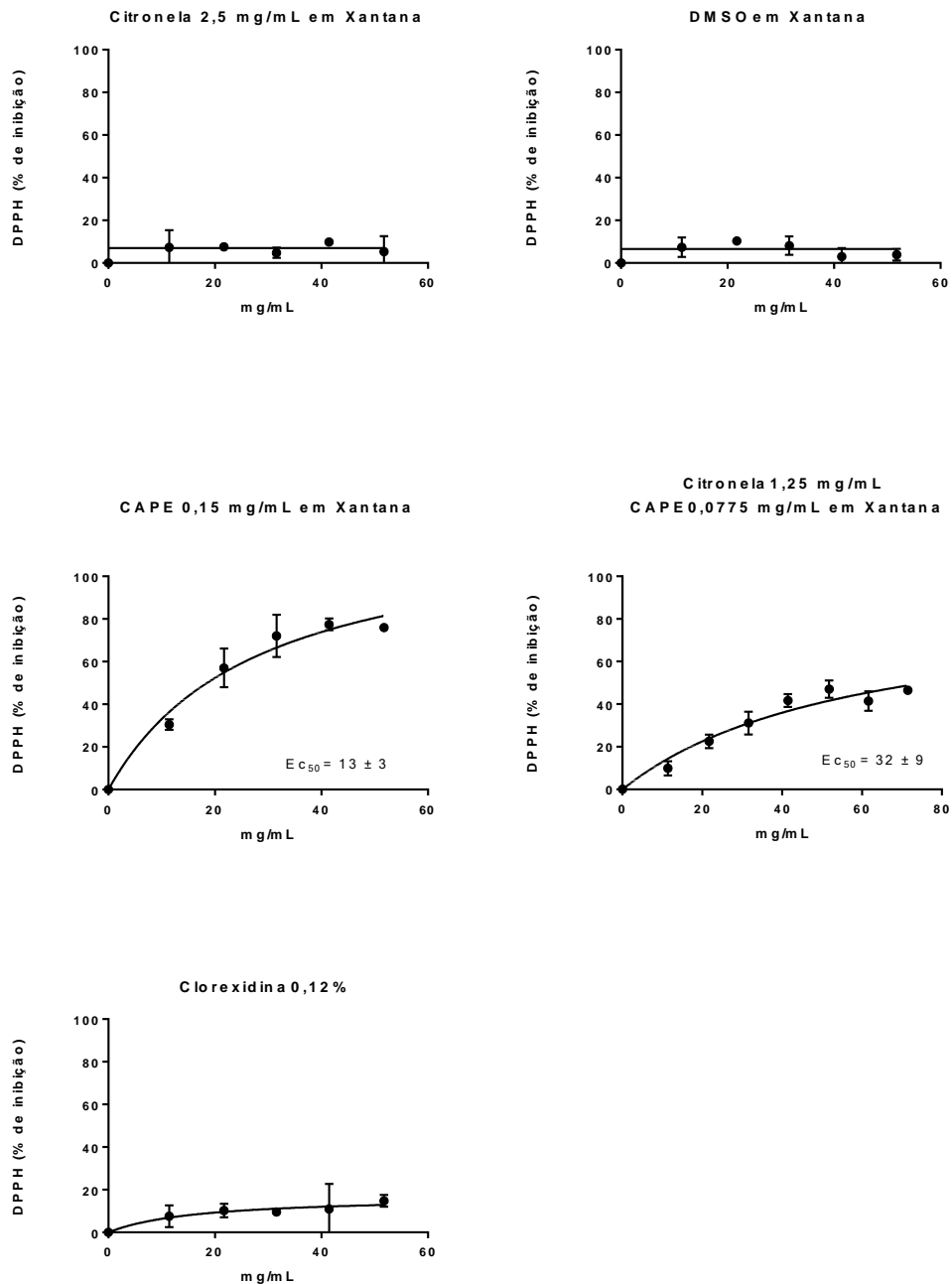


Gráfico 7. Gráficos de análise das absorbâncias das amostras.

Foi possível observar a partir dos gráficos que o CAPE isolado ou na presença de citronela demonstrou atividade antioxidante, sendo possível obter o EC₅₀. Para a solução de citronela 1,25 mg/mL + CAPE 0,0775 mg/mL o EC₅₀ ficou em 32, o que significa que para se ter 50% de supressão do radical livre DPPH, são necessários aproximadamente 32 mg/mL dos compostos ativos. Neste estudo, o CAPE isolado apresentou valores do EC₅₀ ainda melhores, sendo necessários em média 13 mg/mL do composto ativo. Os demais produtos não apresentaram atividade antioxidante detectável pelo ensaio de supressão do radical livre DPPH.

3.4.3 Determinação da atividade antioxidante pelo método de ação redutora sobre radicais peroxila (ORAC)

No ensaio ORAC foi possível analisar a eficiência das soluções em reduzir o radical peroxila. O estudo se baseia em medir a capacidade do composto em estudo em inibir a oxidação da fluoresceína, monitorando o consumo da mesma pela queda de fluorescência. Ao competir com a fluoresceína pelos radicais hidroxila, o composto em estudo promove um atraso no decaimento da fluorescência. Quanto maior este atraso, maior a área do gráfico (fluorescência versus tempo) e maior a eficiência da amostra como redutor de radicais peroxila. Como referência, usa-se o antioxidante trolox. O gráfico 8 mostra o perfil de decaimento de fluorescência da fluoresceína provocado pelos radicais peroxila e o efeito competitivo das soluções em estudo.

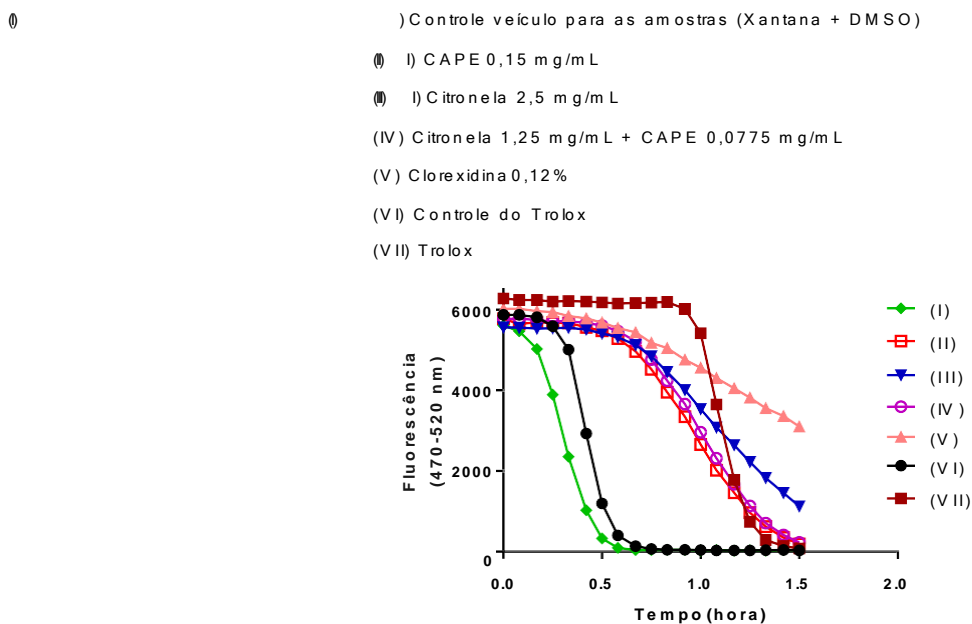


Gráfico 8. Fluorescência versus tempo para as análises das amostras.

A partir das integrais foi possível fazer a diferença das soluções em relação ao controle e comparar a eficiência das mesmas com a eficiência do trolox. Para os cálculos, subtraiu-se as áreas (integrais) do trolox e das soluções teste, da área do controle. Então converte-se os valores de modo a obter valores relativos a trolox (nmols) (Eq. 3).

eq. 3:

$$(\text{Área do Trolox} - \text{Área do Controle}) - 20 \text{ nmol de trolox}$$

$$(\text{Área das Amostras} - \text{Área do Controle}) - x \text{ nmol de trolox}$$

Exemplo de Cálculo

$$(21264150 - 9685800) - 20 \text{ nmol (de trolox)}$$

$$(28214250 - 9685800) - 32,00 \text{ nmol de trolox}$$

Em seguida, correlaciona-se os valores relativos em nmols de trolox com as massas dos materiais de modo a expressar os resultados em valores relativos nmol trolox/mg produto. As massas relativas ao volume utilizado foram:

Tabela 11 – Pesagens dos volumes das amostras.

<i>Volume</i>	<i>Pesagens</i>					<i>Médias</i>
	<i>(mg)</i>					
<i>10 μL</i>	9,9	10,7	10,2	9,2	10,2	10,04

Exemplo de Cálculo:

eq. 4:

$$10,40 \text{ mg} - 32,00 \text{ nmol de trolox}$$

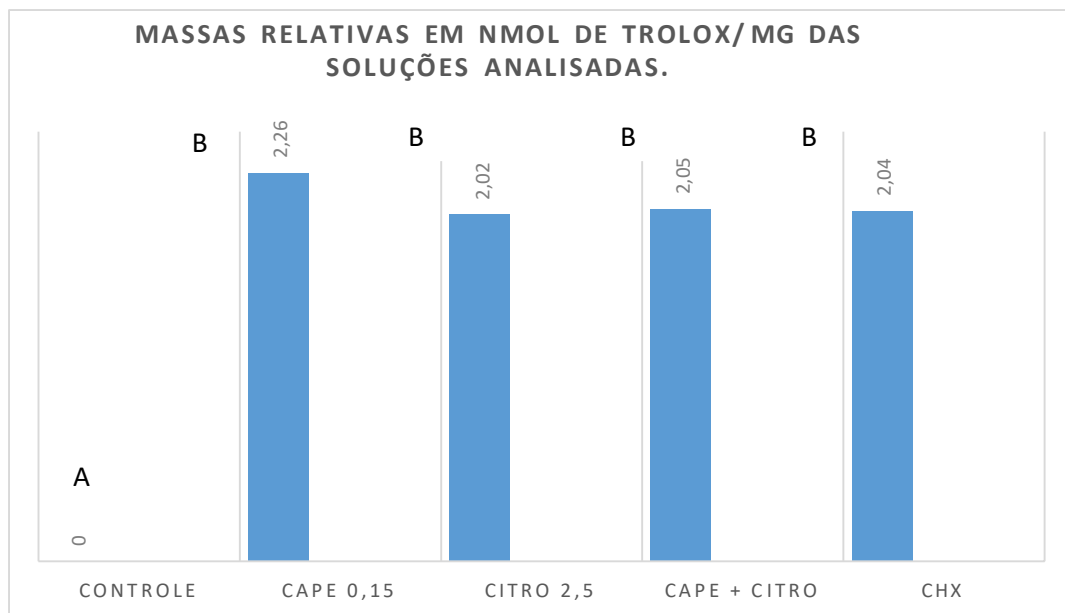
$$1 \text{ mg} - 3,19 \text{ nmol/mg de trolox}$$

Na análise de variância (ANOVA) foi possível observar que houve diferença significativa entre as soluções ($p < .003$), no que se refere aos dados de redução do radical peroxila (Tabela 12).

Tabela 12 - ANOVA para os dados de redução do radical peroxila.

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	p
Soluções teste	10.64	4	2.660	8.56	0.003
Residuals	3.11	10	0.311		

Então plotou-se o gráfico abaixo:



Nota: Médias seguidas de mesma letra maiúscula não diferem ao nível de 5% de significância ($p \leq 0.05$) pelo teste de Tukey.

Gráfico 9. Massas relativas em nmol trolox/mg das soluções analisadas.

Neste gráfico foi possível observar que não houve diferença estatística significativa entre as soluções analisadas em reduzir os radicais peroxila. Houve diferença apenas para a solução controle em relação às demais ($p = 0.003$). Neste ensaio de atividade antioxidante pelo método de ação redutora sobre radicais peroxila não foi possível concluir qual composto ou solução foi a mais antioxidante. O radical peroxila é muito reativo, ficando evidente que todos os princípios ativos contidos nas soluções conseguiram reagir de forma eficiente com os radicais peroxila. Entretanto,

no gráfico 10 abaixo, observou-se que se todos os compostos estivessem na mesma concentração, o CAPE teria o melhor comportamento antioxidante.

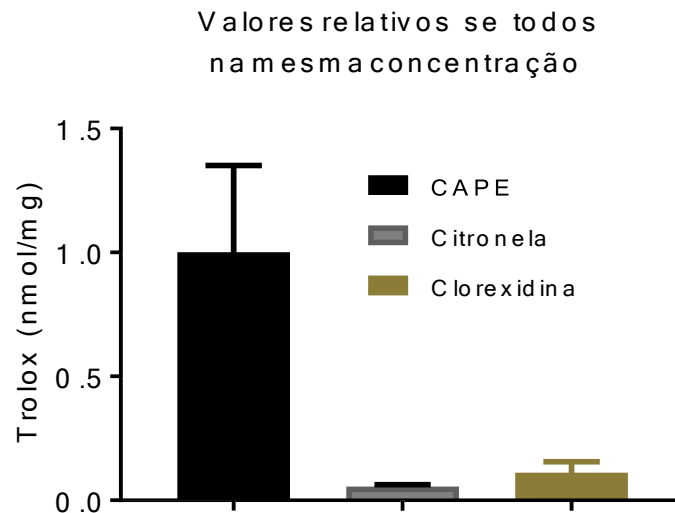


Gráfico 10 – Gráfico de comparação das amostras.

4. DISCUSSÃO

A hipótese deste estudo de que o óleo de citronela isolado e associado ao CAPE apresentaria efeito antifúngico e inibiria o crescimento da espécie *Candida albicans* foi aceita. Ambos os compostos testados apresentaram ação fungicida, em diferentes concentrações, tanto em uso isolado quanto no uso combinado. Conforme os resultados obtidos nos ensaios de CIM/CFM, a solução contendo óleo essencial de citronela apresentou valores de CIM/CFM de 500 µg/mL. De Toledo *et al.*⁴⁵ relataram resultados semelhantes em seu estudo, em que avaliou o efeito antifúngico do óleo essencial de citronela (*Cymbopogon nardus*) em diferentes cepas padrão e clínicas de *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, e *C. parapsilosis*), encontrando uma faixa de valores de CIM/CFM que variaram entre 250-1000 µg/mL. Resultados ainda melhores foram os obtidos para o CAPE no presente estudo, o qual apresentou valores de CIM/CFM aproximadamente 10x menores do que os da citronela, resultando em valores de CIM/CFM de 31 µg/mL. Estes valores estão de acordo com estudos prévios publicados. Sun *et al.*²⁴ verificaram em seu estudo valores

de concentrações inibitórias mínimas de 32 até 64 µg/mL para o CAPE contra espécie de *C. albicans*. De Barros *et al.*⁴⁶ encontraram valores de CIM para o CAPE de 16 até 64 µg/mL, também em espécie de *C. albicans*, estando os valores do presente estudo dentro do range que a literatura científica apresenta.

A atividade antifúngica dos compostos é considerada ativa ou inativa, conforme os seguintes valores de CIM: 50-500 µg/mL, atividade forte/ótima; 600-1500 µg/mL, atividade moderada; acima de 1500 µg/mL, atividade fraca ou produto inativo.⁴⁷⁻⁴⁸⁻⁴⁹ Desta forma, os resultados obtidos para ambos os compostos testados se classificam com uma atividade forte/ótima. Resultados estes que corroboram com estudos já publicados, demonstrando o efeito antifúngico do óleo essencial de citronela e também do composto CAPE contra espécies fúngicas de *Candida*.⁵⁰⁻⁵¹⁻⁴⁶⁻⁵²⁻⁴⁵⁻⁵³

Além disso, foi comprovado o efeito antibiofilme dos compostos, quando utilizados isoladamente e/ou associados entre si. As menores concentrações das soluções contendo óleo essencial de citronela que apresentaram resultados fungicidas foi a de 2,5 mg/mL, para o protocolo de tratamento de 1 min e de 1,25 mg/mL, para o protocolo de 6h, havendo a eliminação completa dos biofilmes. Resultados estes que estão de acordo com estudos já publicados na literatura que investigaram a eficácia e ação antifúngica do óleo essencial da planta *Cymbopogon nardus* em espécies de *Candida* e apresentaram resultados promissores.⁵²⁻⁵³ Para a solução contendo óleo essencial de citronela, utilizada neste estudo, foi utilizada goma xantana, um polissacarídeo produzido por *Xanthomonas campestris*, emulsificante e estabilizante à base de água muito utilizado na indústria alimentícia, apresentando uma boa estabilidade sobre diferentes faixas de temperatura e pH.⁵⁴⁻⁵⁵⁻⁵⁶ A solução contendo óleo essencial de citronela diluída em goma xantana demonstrou resultados satisfatórios e boa ação antifúngica e antibiofilme, tanto utilizada isoladamente quanto associada ao CAPE preservando seu potencial efeito.

O mecanismo de ação da planta *Cymbopogon nardus* se dá pela presença de alguns princípios ativos, como os monoterpenos (citronelal, nerol, geraniol e citronelol), constituintes do óleo de citronela. Estes princípios possuem eficácia evidenciada em estudos prévios da literatura científica.¹⁸⁻²¹⁻⁴⁵ É reportado que a atividade desses compostos ocorra pelo aumento da fluidez e permeabilidade da membrana dos microrganismos, induzindo distúrbios ou lise celular.⁵⁷ Estudos evidenciam a ação e eficácia do geraniol e citronelal em espécies de *C. albicans* e

outras espécies de *Candida*, justificando a alta efetividade das soluções contendo citronela no presente estudo.^{58-20-5 9}

No que se refere ao CAPE, foi possível observar forte ação antifúngica quando utilizada a solução isolada, apresentando maior eficácia nas concentrações de 0,31 mg/mL e 0,15 mg/mL, inibindo completamente o crescimento do fungo. Resultados semelhantes foram observados por Alfarrayeh *et al.*⁵¹, que verificaram que o CAPE tem alta capacidade de inibir o crescimento planctônico e formação de biofilme de diferentes espécies de *Candida* que foram testadas, além de apresentar inibição parcial na formação de biofilmes maduros destes fungos. Foi relatado pelos autores que para a erradicação do biofilme, o efeito foi dose-dependente, variando as concentrações necessárias entre 50-100 µg/mL. Adicionalmente, os autores pontuam que o CAPE apresenta sua atividade antifúngica induzindo a morte celular em *Candida* spp através do encolhimento de protoplasma da célula, morfologia celular e nuclear anormal e distorção das paredes celulares e membranas, que causam alterações na micromorfologia da superfície. Em contrapartida, em outros estudos⁶⁰ é relatado que os mecanismos de ação do CAPE ainda não são bem estabelecidos.

Foi possível verificar uma associação positiva e sinérgica entre os dois compostos testados. Em três diferentes concentrações, CAPE 0,3 mg/mL + Citro 5 mg/mL, CAPE 0,15 mg/mL + Citro 2,5 mg/mL e CAPE 0,07 mg/mL + Citro 1,25 mg/mL, estas associações mataram completamente as células dos biofilmes de 2 hrs-24 hrs. Já na concentração de CAPE 0,03 mg/mL + Citro 0,6 mg/mL houve inibição de forma parcial do biofilme de *C. albicans*, quando o protocolo de 24 h foi utilizado, reduzindo significativamente quando comparada ao grupo controle negativo. Outros estudos na literatura relatam o efeito sinérgico da associação do CAPE a outros fármacos e compostos. Em um estudo conduzido por Sun *et al.*⁶⁰ foi avaliado o efeito do uso combinado de CAPE com o fármaco Caspofungina contra espécies de *C. albicans*. Os autores constataram que ao associar os dois compostos, houve um efeito sinérgico reduzindo os valores de CIM em 16x quando comparados aos valores individuais de cada fármaco, sugerindo que o CAPE pode ser um potencial candidato em aumentar a eficácia de tratamento utilizando a Caspofungina contra infecções fúngicas causadas por *C. albicans*.

Em outro estudo prévio publicado,⁶¹ foi avaliada a interação entre CAPE e o fármaco fluconazol contra *C. albicans*. Nos resultados, é relatado que houve atividade sinérgica positiva entre ambos, potencializando a eficácia de tratamento contra

espécies de *C. albicans* resistentes ao fluconazol, apresentando eficácia terapêutica promissora. Esta atividade sinérgica foi dada devido à diminuição dos valores de CIM nas cepas clínicas isoladas resistentes ao fluconazol. Já com relação ao uso combinado de óleos essenciais, Khan *et al.*⁶² conduziu um estudo avaliando a atividade antifúngica de diferentes óleos essenciais, incluindo derivados do gênero *Cymbopogon*, contra diferentes cepas clínicas e convencionais de *C. albicans*, associando estes fitoterápicos à Anfotericina B e Fluconazol, fármacos convencionais utilizados no tratamento de infecções fúngicas derivadas de *C. albicans*. Como conclusão, os autores pontuam que o uso de óleos essenciais isolados e combinados com antifúngicos convencionais potencializam o manejo terapêutico de pacientes com candidíase, principalmente àquelas causadas por cepas resistentes aos tratamentos convencionais.

O sinergismo obtido da combinação de compostos antifúngicos é alcançada através do aumento da atividade antifúngica, permitindo um amplo espectro de ação, atingindo um número maior de patógenos e, conseqüentemente, atua contribuindo para a diminuição da probabilidade dos fungos em questão desenvolverem resistência aos tratamentos aplicados.⁶²⁻⁶³ Não foram encontrados estudos prévios relatando a combinação entre os compostos CAPE e óleo essencial de citronela, demonstrando a alta contribuição científica e clínica deste estudo através do ineditismo dos resultados obtidos, abrindo novas perspectivas de tratamento com o uso de produtos naturais, podendo futuramente serem desenvolvidos produtos como enxaguatórios bucais e pomadas ou géis antifúngicos mucoadesivos, especialmente diante das condições de resistência aos tratamentos com antifúngicos convencionais.

O teste HET-CAM tem como maior vantagem ser uma alternativa aos testes realizados em animais. Isso se dá devido ao fato de que a CAM (membrana corioalantóica) dos ovos possui vasculatura funcional, podendo ser uma alternativa mais aceita universalmente, pelo fato de não realizar o teste em animais e que apresenta resultados mais rápidos.⁶⁴ Os efeitos que são analisados de forma visual são alterações específicas da membrana e vasos sanguíneos da mesma. Esses efeitos são hemorragia (observada através do aumento de sangramento dos vasos sanguíneos da CAM), a hiperemia (observada através do aumento do calibre dos vasos sanguíneos) e a coagulação (coagulação intravascular ou coagulação extravascular de proteínas, que normalmente aumenta a opacidade da CAM). Esses efeitos são analisados através do tempo de fixação e de reação das soluções usadas

na CAM.⁶⁵⁻⁶⁶ A maior parte das soluções analisadas neste estudo foram classificadas como não irritantes, sendo que apenas a solução isolada de CAPE 0,15 mg/mL e a solução combinada de CAPE 0,038 mg/mL + CITRO 0,625 mg/mL foram classificadas como irritantes leves, provavelmente devido à presença de DMSO na solução, fato este observado também na solução controle do CAPE.

A oxidação é fundamental na vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres possuem elétrons desemparelhados e são encontrados nos átomos de oxigênio ou nitrogênio, denominados ERO ou ERN1-4.⁶⁷ Antioxidantes são moléculas que interagem e podem inibir a iniciação ou propagação de reações em cadeias oxidantes que são geradas através de radicais livres reativos, antes que as moléculas sejam danificadas. Essas reações oxidantes podem causar muitas doenças, incluindo câncer, doença de Parkinson, Alzheimer, distúrbios neurológicos e cardiovasculares. Os antioxidantes agem inibindo a reatividade de radicais livres, através de alguns mecanismos como a doação de hidrogênio, eliminação do radical livre e extinção do oxigênio singlete. Esses antioxidantes podem ser obtidos de forma natural e através de processos químicos sintéticos.⁶⁸

Foram descritos vários métodos de mensuração da atividade antioxidante de substâncias e alimentos, mas todos eles têm em comum a presença de um agente oxidante. Os métodos que determinam a atividade antioxidante são classificados em dois grupos: o primeiro se baseia na captura de radicais livres; o segundo, na determinação da oxidação de uma molécula alvo. No ensaio FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power), o complexo férrico-tripiridiltriazina ($\text{Fe}^3\text{-TPZ}$) é reduzido ao complexo ferroso ($\text{Fe}^2\text{-TPZ}$), na presença de um antioxidante e em condições ácidas. O complexo formado por esta reação possui uma coloração azul intensa, com absorção máxima a 593 nm. O ensaio FRAP é simples, rápido e pode ser realizado de forma automatizada, semiautomática ou por métodos manuais.⁷³ O mecanismo antifúngico do CAPE pode incluir carência de ferro intracelular devido à sua capacidade de formar complexos insolúveis com íons de ferro, levando à prevenção da absorção de ferro pelas células⁶⁰. Os resultados deste estudo utilizando esse tipo de ensaio demonstram que a presença do CAPE nas soluções potencializa capacidade antioxidante das soluções, fato não demonstrado nas soluções contendo citronela isoladamente.

O ensaio ORAC tem como intuito verificar a capacidade sequestradora de um antioxidante pela formação de um radical peroxila que é gerado pela reação do 2,2'-azobis(2-amidinopropano)dihidroclorato ou AAPH, na temperatura de 37°C com oxigênio atmosférico. O radical gerado reage com uma molécula fluorescente formando um produto não fluorescente. E a inibição do decaimento da fluorescência em função do tempo se correlaciona com a eficiência do antioxidante em estudo. Assim, os resultados deste estudo demonstraram que o CAPE na concentração usada, promoveu um melhor índice de queda no tempo de meia hora da fluoresceína quanto comparado aos outros grupos, se analisada a concentração bem mais baixa deste princípio ativo na solução.

O método de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil-hidrato) é um ensaio antioxidante baseado na transferência de elétrons produzindo uma solução violeta em etanol. Esse radical livre, estável à temperatura ambiente, é reduzido na presença de uma molécula antioxidante, originando uma solução de etanol amarelada⁷⁵. Os valores de EC50 para os ensaios de eliminação de radicais livres foram calculados pelo melhor ajuste conforme aplicável para esse ensaio (regressão logarítmica para ensaio DPPH)⁷⁵. Segundos os resultados obtidos os grupos de CAPE e CAPE 0,0775mg/ml + CITRO 1,25mg/ml demonstraram resultados antioxidantes positivos, diferente dos demais grupos.

O CAPE já é utilizado na medicina moderna por conta de suas propriedades positivas. Ozden *et al.*⁶⁹, concluiu que o CAPE mostrou ter um efeito benéfico na redução do estado oxidante local dos tecidos gengivais nos modelos experimentais de periodontite ativando mecanismos de defesa celular contra o estresse oxidativo, incluindo diminuições na superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e expressão de glutathione S-transferase (GST). O CAPE tem boas propriedades anti-inflamatórias também sendo capaz de ter uma modulação da cascata do ácido araquidônico em comparação a outros componentes da própolis.⁷⁰ O CAPE também é capaz de suprimir a expressão de mediadores inflamatórios induzidos por H₂O₂, como TNF- α e COX-2.⁷¹ Tolba⁷² relata outras funções anti-inflamatórias e antioxidantes do CAPE, como inibição da anafilaxia cutânea passiva mediada por imunoglobulinas e redução e supressão de histamina, dentre outras funções em relação a doenças neurodegenerativas.

A planta *Cymbopogon nardus* é utilizada para a extração de óleo essencial, mesmo não havendo uma capacidade antioxidante parecida com a do CAPE, estudos

relatam⁷² que a citronela apresenta bons resultados de atividade antioxidante, isso se dá por conta do alto teor de monoterpeno, porém menor que do ácido gálico, que é usado como padrão. Por conta dos monoterpenos encontrados na sua composição, a citronela também contém atividades anticancerígenas, inibindo a proliferação de células LNCaP e HeLa⁷¹. Também, no mesmo estudo foi relatado que o OE de citronela possui atividades anti-inflamatórias inibindo a lipoxigenase.⁷¹

O sinergismo do CAPE com a citronela em várias concentrações, demonstraram resultados positivos em todos os ensaios analisados neste estudo, diminuindo as concentrações dos princípios ativos, o que de maneira geral é muito bom, pois diminui o potencial citotóxico das soluções. O sinergismo observado neste estudo, está de acordo com Sun et al.⁶⁰ que relataram que o CAPE associado ao fluconazol apresentou uma boa sinergia, podendo ser um método alternativo de combate à *Candida albicans*.

Estas observações são particularmente importantes devido ao aumento da incidência de infecções orais, especialmente por outras espécies de *Candida*, como a *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. guilliermondii*, que são resistentes a agentes antifúngicos. Além deste fato, as soluções comercialmente disponíveis, como a clorexidina, causam efeitos colaterais ao paciente. Por estas razões, o estudo das soluções fitoterápicas naturais é promissor para a prevenção da estomatite relacionada com próteses dentárias, representando um método alternativo em reduzir a colonização por *Candida*. Embora o enfoque deste estudo tenha sido sobre soluções enxaguatórias/antissépticos bucais ou pomadas e géis mucoadesivos, muitas outras possibilidades de uso destas formulações poderão ser investigadas a partir desses resultados.

5. CONCLUSÕES

Com base nos resultados deste estudo, concluiu-se que:

- As soluções de citronela e CAPE, associadas ou não, apresentam ação antifúngica e antibiofilme, em diferentes concentrações;
- Ficou evidente o sinergismo das soluções de CAPE e citronela neste estudo;
- A maioria das soluções são capazes de induzir irritabilidade à membrana CAM;
- As soluções de citronela associada ao CAPE e CAPE isoladamente, demonstram atividade antioxidante satisfatórias.

Referências

- 1 Huber, M., Terézhalmy, G. Oropharyngeal candidiasis: etiology, epidemiology, clinical manifestations, diagnosis, and treatment. *Crest Oral-B* 2011;1:1-16.
- 2 Dabas P. An approach to etiology, diagnosis and management of different types of candidiasis. *Academic Journal*. 2013;4:63-74.
- 3 Farah C, Kazoullis A, Saunus J. Cellular and molecular mechanisms of resistance to oral *Candida albicans* infections. *Frontiers in Bioscience*. 2008; 13: 5345-58.
- 4 Pappas PG, et al. Clinical Practice Guideline for the Management of Candidiasis: 2016 Update by the Infectious Diseases Society of America. *Clinical Infectious Diseases* 2016;62:1-50.
- 5 Carlo, H. et al. Does scientific evidence for the use of natural products in the treatment of oral candidiasis exist? A systematic review, Evidence-based complementary and alternative medicine 2015; 2015:1-8.
- 6 Salerno C, et al. *Candida* associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;16:139-43.
- 7 Javed, F. Romanos, G. e Samaranayake, L. Treatment of oral fungal infections using antimicrobial photodynamic therapy: a systematic review of currently available evidence. *Photochem Photobiol Sciences* 2014;13:726-734.
- 8 Jin L, Leung W, Samaranayake L. Oral mucosal fungal infections. *Periodontology* 2000 2009;49:39-59.
- 9 Pires FR, Santos EB, Bonan PR, De Almeida OP, Lopes MA. Denture stomatitis and salivary *Candida* in Brazilian edentulous patients. *J Oral Rehabil* 2002;29:1115-9.
- 10 Jeganathan S, Lin CC. Denture stomatitis--a review of the aetiology, diagnosis and management. *Aust Dent J* 1992;37:107-14.
- 11 Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med* 1999;10:359-83.
- 12 Coco BJ, et al. Mixed *Candida albicans* and *Candida glabrata* populations associated with the pathogenesis of denture stomatitis. *Oral Microbiol Immunol* 2008;23:377-83.
- 13 Leonhardt A, Renvert S, Dahlén G. Microbial findings at failing implants. *Clin Oral Implants Res* 1999;10:339-45.
- 14 Quindós G, et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2019;24:172-180.
- 15 Perea S., et al. Prevalence of Molecular Mechanisms of Resistance to Azole Antifungal Agents in *Candida albicans* Strains Displaying High-Level Fluconazole Resistance

Isolated from Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 2001;45:2676-2684.

16 Pfaller MA, et al. Epidemiology of Invasive Candidiasis: a Persistent Public Health Problem. *Clinical microbiology reviews* 2007;20:133-163.

17 Berretta AA, et al. Evaluation of Mucoadhesive Gels with Propolis (EPP-AF) in Preclinical Treatment of Candidiasis Vulvovaginal Infection. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2013;2013:1-14.

18 Nakahara K, et al. Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Cymbopogon nardus* (Citronella grass). *Japan Agricultural Research Quarterly* 2003;37:249-252]

19 Pereira FO, et al. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. *Pharmaceutical Biology* 2015;53:228-234.

20 Cunha, BG. 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; 109; 1-10.

21 Ahmad A, Viljoen A. The in vitro antimicrobial activity of *Cymbopogon* essential oil (lemon grass) and its interaction with silver ions. *Phytomedicine* 2015;22:657-65.

22 Koba K, et al. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol* 2009;4:29-34.

23 Guiotti AM, et al. Comparison of conventional and plant-extract disinfectant solutions on the hardness and color stability of a maxillofacial elastomer after artificial aging. *J Prosthet Dent* 2016;115:501-8.a

24 Sun L, et al. Caffeic Acid Phenethyl Ester Synergistically Enhances the Antifungal Activity of Fluconazole Against Resistant *Candida Albicans*. *Phytomedicine* 2018;40:55-58.

25 Mai F, et al. Critical Review Caffeic Acid Phenethyl Ester, a Promising Component of Propolis with a Plethora of Biological Activities: A Review on its Anti-inflammatory, Neuroprotective, Hepatoprotective, and Cardioprotective Effects. *International Union of Biochemistry and Molecular Biology* 2013;65:699-709.

26 Michaluart P, et al. Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester on the activity and expression of cyclooxygenase-2 in human oral epithelial cells and in a rat model of inflammation. *Cancer Res* 1999;59:2347-2352.

27 Park, EH., Kahng. JH. Suppressive effects of propolis in rat adjuvant arthritis. *Arch Pharm Res (Seoul)* 1999;22:554-558.

- 28 Chen YJ, Shiao MS, Wang SY. The antioxidant caffeic acid phenethyl ester induces apoptosis associated with selective scavenging of hydrogen peroxide in human leukemic HL-60 cells. *Anti Cancer Drugs* 2001;12:143-149.
- 29 Kızıldağ A, et al. Therapeutic effects of caffeic acid phenethyl ester on alveolar bone loss in rats with endotoxin-induced periodontitis. *Journal of Dental Sciences* 2019;14:339-345.
- 30 Koltuksuz U, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester and epidermal growth factor on the development of caustic esophageal stricture in rats. *J Pediatr Surg* 2001;36:1504-1509.
- 31 Ha J, et al. Caffeic acid phenethyl ester inhibits osteoclastogenesis by suppressing NFκB and downregulating NFATc1 and c-Fos. *Int Immunopharmacol* 2009;9:774-780.
- 32 Celik S, et al. Caffeic acid phenethyl ester suppresses oxidative stress in Escherichia coli-induced pyelonephritis in rats. *Mol Cell Biochem* 2007; 297:131-138.
- 33 Kazancıoğlu HO, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on wound healing in calvarial defects. *Acta Odontol Scand* 2015;73:21-27.
- 34 Kazancıoğlu HO, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture. *Drug Des Dev Ther.* 2015;9:6483-6488.
- 35 Ucan MC, et al. Influence of caffeic acid phenethyl ester on bone healing in a rat model. *J Int Med Res* 2013;41:1648-1654.
- 36 Mor A, Hani K, Nicolas PJ. The vertebrate peptide antibiotics dermaseptins have overlapping structural features but target specific microorganisms. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:31635-31641.
- 37 Luepke NP. Hen's egg chorioallantoic membrane test for irritation potential. *Food Chem Toxicol* 1985;23:287-291.
- 38 Ardlin BI, Dahl JE, Tibballs JE. 2005. Static immersion and irritation tests of dental metal-ceramic alloys. *Eur J Oral Sci* 2005;113:83-89.
- 39 Dahl JE. Potential of dental adhesives to induce mucosal irritation evaluated by the HET-CAM method. *Acta Odontol Scand* 2007;65:275-283.
- 40 Freire PL, et al. Action of silver nanoparticles towards biological systems: cytotoxicity evaluation using hen's egg test and inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation. *Int J Antimicrob Agents* 2015;45:183-187.
- 41 Marquardt C, et al. Evaluation of the tissue toxicity of antiseptics by the hen's egg test on the chorioallantoic membrane (HETCAM). *Eur J Med Res* 2010;15:204-209.

42 Hagino S, et al. Interlaboratory validation of in vitro eye irritation tests for cosmetic ingredients. (2) Chorioallantoic membrane (CAM) test. *Toxicol In Vitro* 1999;13:99-113.

43 Stratil P, Klejdus B, Kubán V. Determination of total content of phenolic compounds and their antioxidant activity in vegetables--evaluation of spectrophotometric methods. *J Agric Food Chem* 2006;54:607-616.

44 Campos AM, Sotomayor CP, Pino E, Lissi E. A pyranine based procedure for evaluation of the total antioxidant potential (TRAP) of polyphenols. A comparison with closely related methodologies. *Biol Res* 2004;37:287-292.

45 De Toledo LG, Ramos MA, Spósito L, Castilho EM, Pavan FR, Lopes Éde O. et al. Essential Oil of *Cymbopogon nardus* (L.) Rendle: A Strategy to Combat Fungal Infections Caused by *Candida* Species. *Int J Mol Sci* 2016;17:1252.

46 de Barros PP, Rossoni RD, Garcia MT, Kaminski VL, Loures FV, Fuchs BB, Mylonakis E, Junqueira JC. The Anti-Biofilm Efficacy of Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) *In Vitro* and a Murine Model of Oral Candidiasis. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Aug 2;11:700305.

47 Holetz FB, Pessini GL, Sanches NR, Cortez DA, Nakamura CV, Filho BP. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002;97:1027-

48 Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder VLG. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol* 2004;35:275-80.

49 Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem* 2001;49:4168-70.

50 Possamai Rossatto FC, Tharmalingam N, Escobar IE, d'Azevedo PA, Zimmer KR, Mylonakis E. Antifungal Activity of the Phenolic Compounds Ellagic Acid (EA) and Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) against Drug-Resistant *Candida auris*. *J Fungi (Basel)*. 2021 Sep 15;7(9):763.

51 Alfarrayeh I, Pollák E, Czéh Á, Vida A, Das S, Papp G. Antifungal and Anti-Biofilm Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on Different *Candida* Species. *Antibiotics (Basel)*. 2021 Nov 7;10(11):1359.

52 Trindade LA, de Araújo Oliveira J, de Castro RD, de Oliveira Lima E. Inhibition of adherence of *C. albicans* to dental implants and cover screws by *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal. *Clin Oral Investig* 2015;19:2223-31.

53 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;109:1-10.

54 Espert M, Salvador A, Sanz T. Rheological and microstructural behaviour of xanthan gum and xanthan gum-Tween 80 emulsions during in vitro digestion. *Food Hydrocoll* 2019;95:454-61.

55 Fu D, Deng S, McClements DJ, Zhou L, Zou L, Yiet J. et al. Encapsulation of β -carotene in wheat gluten nanoparticle-xanthan gum-stabilized Pickering emulsions: Enhancement of carotenoid stability and bioaccessibility. *Food Hydrocoll* 2019;89:80-9.

56 Riquelme N, Robert P, Troncoso E, Arancibia C. Influence of the particle size and hydrocolloid type on lipid digestion of thickened emulsions. *Food Funct* 2020;11:5955-64.

57 Di Pasqua R, Betts G, Hoskins N, Edwards M, Ercolini D, Mauriello G. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. *J Agric Food Chem* 2007;55:4863-7.

58 Singh S, Fatima Z, Hameed S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. *Rev Soc Bras Med Trop* 2016;49:465–72.

59 Singh S, Fatima Z, Hameed S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpene geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. *Arch Microbiol* 2016;198:459-472.

60 Sun L, Hang C, Liao K. Synergistic effect of caffeic acid phenethyl ester with caspofungin against *Candida albicans* is mediated by disrupting iron homeostasis. *Food Chem Toxicol.* 2018 Jun;116(Pt B):51-58.

61 Sun L, Liao K, Hang C. Caffeic acid phenethyl ester synergistically enhances the antifungal activity of fluconazole against resistant *Candida albicans*. *Phytomedicine.* 2018 Feb 1;40:55-58.

62 Khan MS, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol.* 2012 Jan;50(1):33-42.

63 Vazquez JA. Combination antifungal therapy against *Candida* species: the new frontier-are we there yet? *Med Mycol* 2003; 41: 355-368.

64 - Bagley DM, Waters D, Kong BM. Development of a 10-day chorioallantoic membrane vascular assay as an alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Food Chem Toxicol.* 1994;32:1155-60

65 Stelling W, Bracher M, Coutellemont P, Silva O. The HET-CAM, a useful in vitro assay for assessing the eye irritation properties of cosmetic formulations and Ingredients. *Toxicol In Vitro* 1999-13-375-84.

66 Rivero, M. N., Lenze, M., Izaguirre, M., Pérez Damonte, S. H., Aguilar, A., Wikinski, S., & Gutiérrez, M. L. (2021). Comparison between HET-CAM protocols and a product use clinical study for eye irritation evaluation of personal care products including cosmetics according to their surfactant composition. *Food and Chemical Toxicology*, 153, 112229.

67 Barreiros, A. L. B. S., David, J. M., & David, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 2006, 29(1), 113-123.

68 Sirivibulkovit, K., nouanthavong, S., & sameenoi, Y. Paper-based DPPH Assay for Antioxidant Activity Analysis. *Analytical Sciences*,:2018:34(7),795-800.

69 Otan Özden, F., Lütfioğlu, M., Demir, E., & Bilgici, B. Antioxidant effect of caffeic acid phenethyl ester in experimentally induced periodontitis. *Clinical Oral Investigations*. 2021, 25(8), 4959-4966.

70 Tolba, M. F., Azab, S. S., Khalifa, A. E., Abdel-Rahman, S. Z., & Abdel-Naim, A. B. Caffeic acid phenethyl ester, a promising component of propolis with a plethora of biological activities: A review on its anti-inflammatory, neuroprotective, hepatoprotective, and cardioprotective effects. *IUBMB Life*. 2013, 65(8), 699-709.

71 Song, Jae-Jun & Lim, Hyun & Kim, Kihyoung & Kim, Kyoung-Min & Cho, Sunyoung & Chae, Sung-Won. . Effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on H₂O₂ induced oxidative and inflammatory responses in human middle ear epithelial cells. *International journal of pediatric otorhinolaryngology*, 2012.76. 675-9.

72 Bayala, B., et al. Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and antiproliferative activities of the essential oil of *Cymbopogon nardus*, a plant used in traditional medicine. *Biomolecular Concepts*. 2020, 11(1), 86-96.

73 Prior, R. L., Wu, X., & Schaich, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005, 3(10), 4290-4302.

74 Munteanu, I. G., & Apetrei, C. Analytical Methods Used in Determining Antioxidant Activity: A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(7), 3380.

75 Nyayiru Kannaian, U. P., Edwin, J. B., Rajagopal, V., Nannu Shankar, S., & Srinivasan, B. *Phytochemical composition and antioxidant activity of coconut cotyledon*, *Heliyon*, 2020, 6(2), 3411.

ANEXOS

ANEXO A

L-3377
S/FC

Fagron
FARMACÊUTICOS
MÉDICINA

CERTIFICADO DE ANÁLISE

Insumo:	OLEO ESSENCIAL CITRONEL WN	Data de Análise:	06-01-2020
Lote Interno:	19L21-B022-056711	Lote Fabricante:	04428/19
Data de Fabricação:	27-11-2019	Data de Validade:	27-11-2021
Origem:	Brasil	Procedência:	Brasil
Condições de Armazenamento:	Temperatura Ambiente	Ordem de Fracionamento:	056711

DCB:	-	DCI:	-
CAS:	8000-29-1	Peso Molecular:	-
Fórmula Molecular:	-		
Observações:		Nome Científico:	Cymbopogon nardus

Testes	Especificações	Resultados	Unidade	Referências
Descrição	Líquido límpido.	Conforme		Fabricante
Cor	Amarelo claro a amarelo escuro.	Conforme		Fabricante
Impurezas	Isento.	Conforme		Fabricante
Odor	Característico.	Conforme		Fabricante
Densidade	0,875 - 0,895 (20°C)	0,881	g/mL	Fabricante
Índice de refração	1,455 - 1,475 (20°C)	1,467		Fabricante

* Resultados obtidos em análises realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade SM EMPREENDIMENTOS FARMACÊUTICOS LTDA. E os demais foram transcritos conforme certificado de análise do fabricante.

Conclusão:

Aprovado (X)

Reprovado ()



Farmacêutico Responsável
João Paulo Sartin Mendes
CRF-GO: Nº 7.355
Fagron Services Brasil

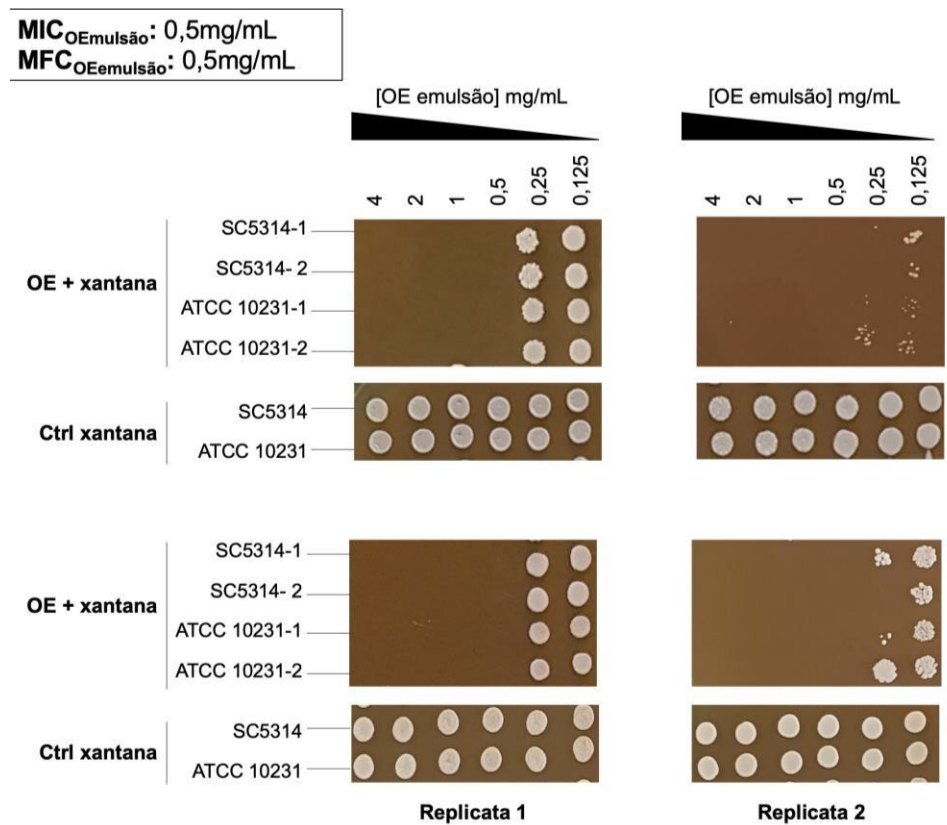


Farmacêutico Responsável
Amanda R. Victorino
CRF-SP Nº 50.836
Fagron Brasil
SAT: (11) 4795-5600

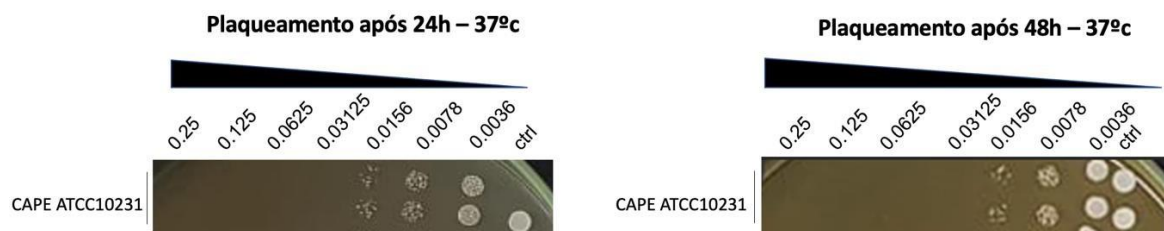
Fim do Documento

ANEXO B– Figuras e Tabelas dos testes de MIC, MFC e biofilme

Resultados dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para a espécie de *C. albicans* (ATCC 10231) com a solução de óleo essencial de citronela diluída em goma xantana, realizados em duplicata, para os tempos de 24 H e 48 H.



Resultados do ensaio de concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) para a espécie de *C. albicans* (ATCC 10231) com a solução contendo CAPE, realizados em duplicata, para os tempos de 24 H e 48 H.



Valores de UFCs/mL após tratamento de 1 minuto, com as diferentes soluções de OE de citronela e CAPE isoladamente, em biofilmes de *C. albicans*, no protocolo de 2h de pré-adesão.

Amostras N=8	Controle Negativo	Controle Xantana	Controle CAPE	CHX 0,12%	Citronela 5 mg/mL	Citronela 2,5mg/mL	Citronela 1,25mg/mL	CAPE 0,31mg/mL	CAPE 0,15mg/ mL	CAPE 0,0775mg/ mL
1	1,72x10 ⁵	2,94x10 ⁴	4,32x10 ⁴	0	0	0	1,58x10 ³	0	0	1,50x10 ³
2	2,20x10 ⁵	3,54x10 ⁴	3,42x10 ⁴	0	0	0	1,90x10 ³	0	0	1,56x10 ³
3	4,14x10 ⁴	3,20x10 ⁴	2,52x10 ⁶	0	0	0	1,42x10 ³	0	0	2,84x10 ³
4	2,86x10 ⁴	5,48x10 ⁴	4,74x10 ⁴	0	0	0	2,08x10 ³	0	0	2,42x10 ³
5	4,80x10 ⁴	1,72x10 ⁵	4,92x10 ⁴	0	0	0	1,86x10 ³	0	0	2,58x10 ³
6	6,62x10 ⁴	3,56x10 ⁴	5,58x10 ⁴	0	0	0	2,08x10 ³	0	0	2,18x10 ³
7	4,72x10 ⁴	2,46x10 ⁴	3,44x10 ⁴	0	0	0	2,74x10 ³	0	0	2,82x10 ³
8	3,74x10 ⁴	3,02x10 ⁴	3,72x10 ⁴	0	0	0	3,22x10 ³	0	0	2,62x10 ³

Valores de UFCs/mL após tratamento de 1 minuto com as diferentes soluções associadas, em biofilmes de *C. albicans*, no protocolo de 2h de pré-adesão.

Amostras N=8	Controle Negativo	Controle Xantana	Controle CAPE	CHX 0,12%	CAPE (0,31mg/mL) + CITRO (5mg/mL)	CAPE (0,15mg/mL) + CITRO (2,5mg/mL)	CAPE (0,0775mg/mL) + CITRO (1,25mg/mL)	CAPE (0,038mg/mL) + CITRO (0,625mg/mL)	CAPE (0,019mg/mL) + CITRO (0,312mg/mL)
1	1,72x10 ⁵	2,94x10 ⁴	4,32x10 ⁴	0	0	0	0	0	5,96x10 ³
2	2,20x10 ⁵	3,54x10 ⁴	3,42x10 ⁴	0	0	0	0	0	3,02x10 ⁴
3	4,14x10 ⁴	3,20x10 ⁴	2,52x10 ⁶	0	0	0	0	0	4,02x10 ³
4	2,86x10 ⁴	5,48x10 ⁴	4,74x10 ⁴	0	0	0	0	0	2,10x10 ⁴
5	4,80x10 ⁴	1,72x10 ⁵	4,92x10 ⁴	0	0	0	0	0	3,74x10 ³
6	6,62x10 ⁴	3,56x10 ⁴	5,58x10 ⁴	0	0	0	0	0	1,62x10 ⁴
7	4,72x10 ⁴	2,46x10 ⁴	3,44x10 ⁴	0	0	0	0	0	1,88x10 ⁴
8	3,74x10 ⁴	3,02x10 ⁴	3,72x10 ⁴	0	0	0	0	0	3,72x10 ⁴

Valores de UFCs/mL após tratamento de 6 horas com as diferentes soluções de OE de citronela e CAPE isoladamente, em biofilmes de *C. albicans*, no protocolo de 24 h de formação do biofilme.

Amostras N=8	Controle Negativo	Controle Xantana	Controle CAPE	CHX 0,12%	CITRO 5mg/mL	CITRO 2,5mg /mL	CITRO 1,25mg/ mL	CITRO 0,625mg/ mL	CAPE 0,31mg/ mL	CAPE 0,15mg/ mL	CAPE 0,0775mg/ mL
1	1,34x10 ⁷	6,50x10 ⁶	4,16x10 ⁶	0	0	0	0	1,60x10 ⁶	0	0	2,20x10 ⁵
2	1,28x10 ⁷	6,28x10 ⁶	3,68x10 ⁶	0	0	0	0	1,30x10 ⁶	0	0	2,40x10 ⁴
3	1,74x10 ⁷	5,40x10 ⁶	3,86x10 ⁶	0	0	0	0	2,10x10 ⁶	0	0	2,98x10 ⁴
4	3,30x10 ⁷	1,38x10 ⁷	2,08x10 ⁷	0	0	0	0	1,58x10 ⁷	0	0	1,38x10 ⁶
5	2,80x10 ⁷	1,54x10 ⁷	2,24x10 ⁷	0	0	0	0	2,60x10 ⁶	0	0	1,72x10 ⁶
6	2,16x10 ⁷	2,26x10 ⁷	1,72x10 ⁷	0	0	0	0	4,42x10 ⁶	0	0	1,42x10 ⁶
7	1,90x10 ⁷	5,0x10 ⁶	2,10x10 ⁷	0	0	0	0	2,02x10 ⁷	0	0	1,66x10 ⁶
8	1,76x10 ⁷	3,60x10 ⁷	2,16x10 ⁷	0	0	0	0	3,48x10 ⁶	0	0	1,66x10 ⁶

Valores de UFCs/mL após tratamento de 6 horas com as diferentes soluções de OE de citronela e CAPE associados, em biofilmes de *C. albicans*, no protocolo de 24 h de formação do biofilme.

Amostras N=8	Controle Negativo	Controle Xantana	Controle CAPE	CHX 0,12%	CAPE (0,3mg/mL) + CITRO (5mg/mL)	CAPE (0,15mg/mL) + CITRO (2,5mg/mL)	CAPE (0,0775mg/mL) + CITRO (1,25mg/mL)	CAPE (0,038 mg/mL) + CITRO (0,625mg/mL)
1	1,34x10 ⁷	6,50x10 ⁶	4,16x10 ⁶	0	0	0	0	1,62x10 ⁴
2	1,28x10 ⁷	6,28x10 ⁶	3,68x10 ⁶	0	0	0	0	5,28x10 ³
3	1,74x10 ⁷	5,40x10 ⁶	3,86x10 ⁶	0	0	0	0	1,58x10 ³
4	3,30x10 ⁷	1,38x10 ⁷	2,08x10 ⁷	0	0	0	0	4,82x10 ³
5	2,80x10 ⁷	1,54x10 ⁷	2,24x10 ⁷	0	0	0	0	5,78x10 ³
6	2,16x10 ⁷	2,26x10 ⁷	1,72x10 ⁷	0	0	0	0	4,58x10 ³
7	1,90x10 ⁷	5,0x10 ⁶	2,10x10 ⁷	0	0	0	0	1,66x10 ⁴
8	1,76x10 ⁷	3,60x10 ⁷	2,16x10 ⁷	0	0	0	0	4,76x10 ³

ANEXO C – Fotos do estudo *ex vivo* do potencial de irritação das soluções em membrana cório-alantóide de ovo de galinha

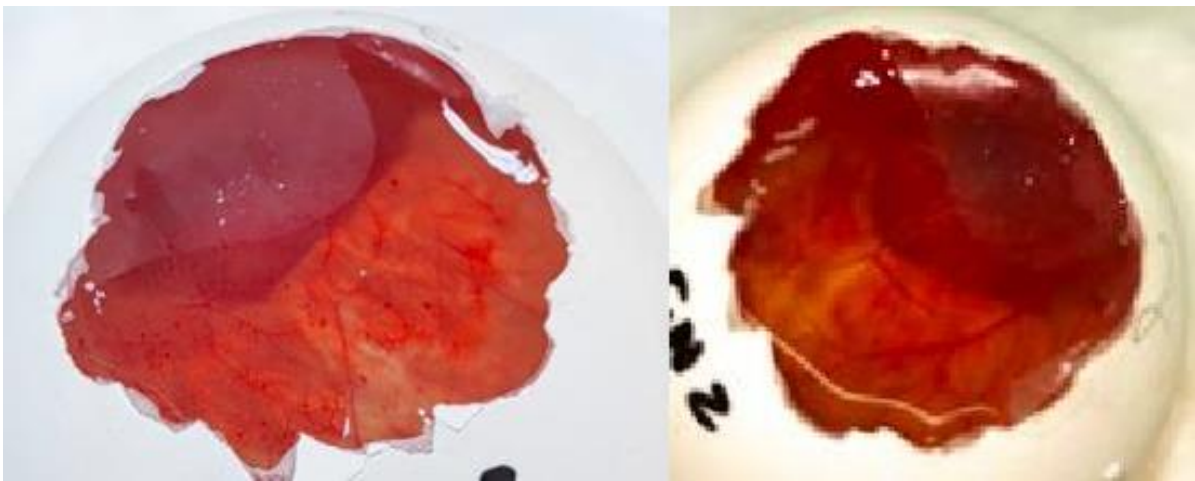
CONTROLE POSITIVO – NaOH (HEMORRAGIA)



ANTES

DEPOIS

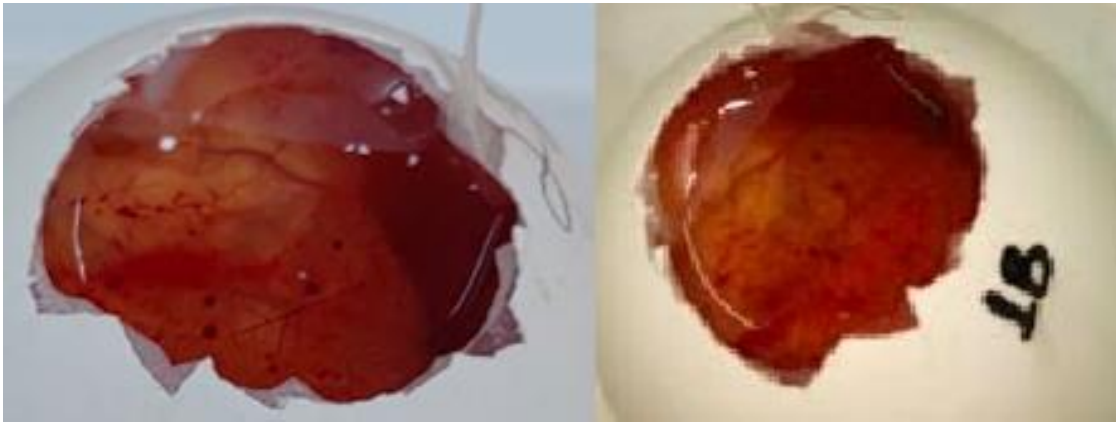
CONTROLE NEGATIVO – SALINA



ANTES

DEPOIS

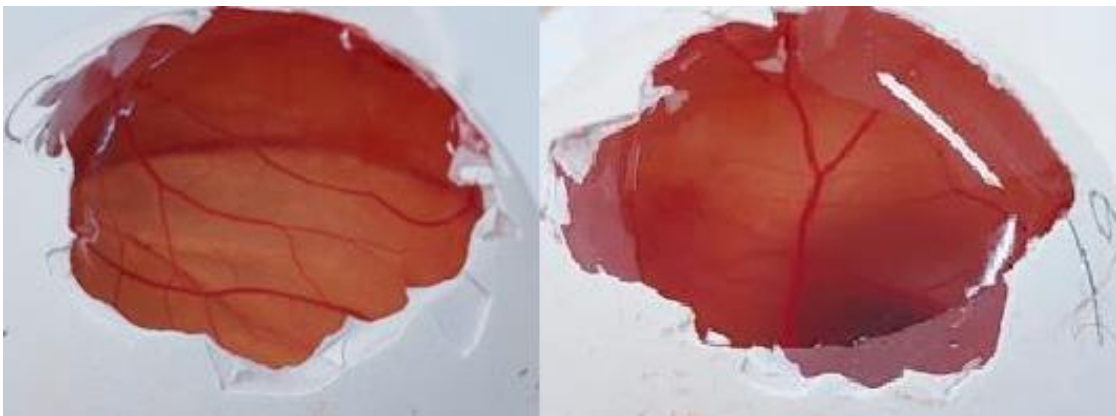
CLOREXIDINA 0,12%



ANTES

DEPOIS

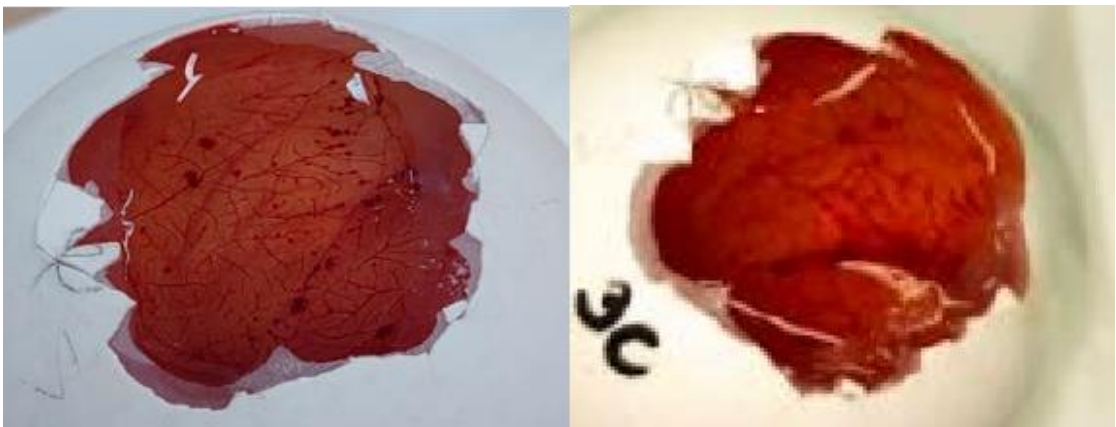
CONTROLE XANTANA



ANTES

DEPOIS

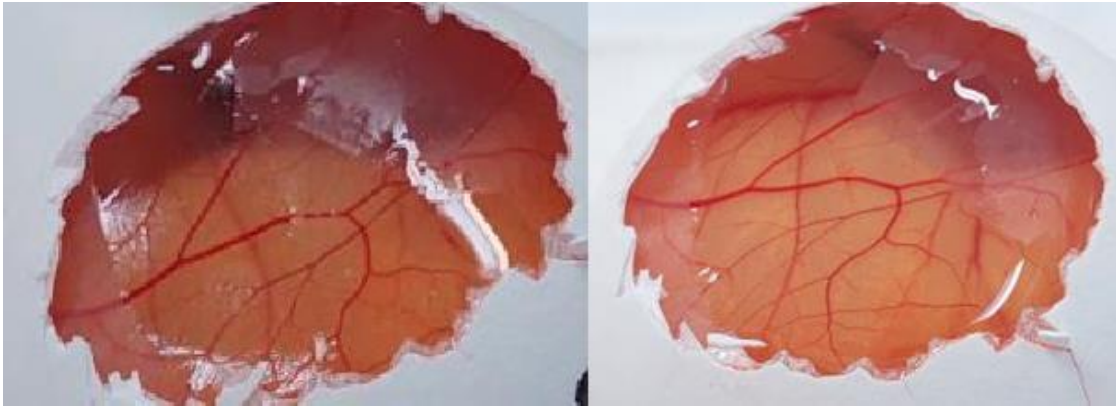
CONTROLE CAPE (HEMORRAGIA)



ANTES

DEPOIS

CITRO 1,25 MG/ML



ANTES

DEPOIS

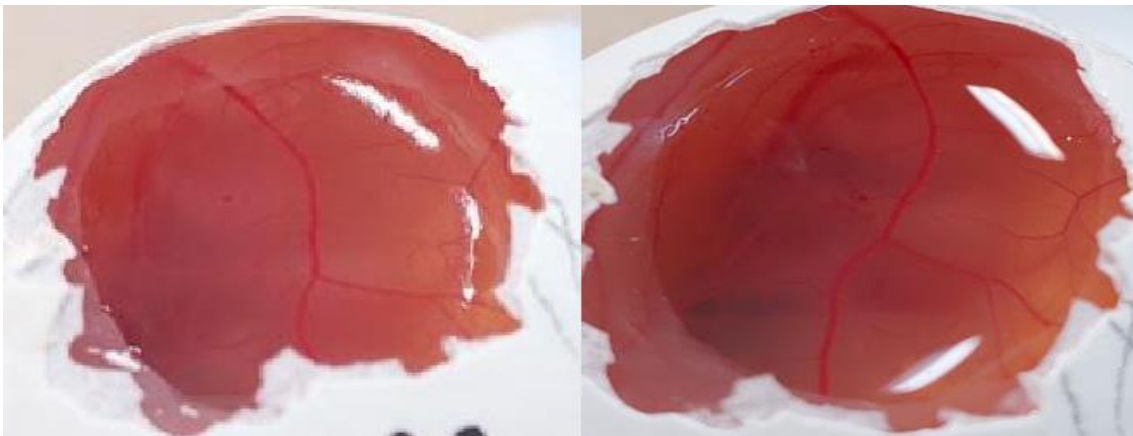
CAPE 0,038 MG/ML E CITRO 0,625 MG/ML - HEMORRAGIA



ANTES

DEPOIS

CITRO 2,5 mg/mL - Hiperemia



ANTES

DEPOIS

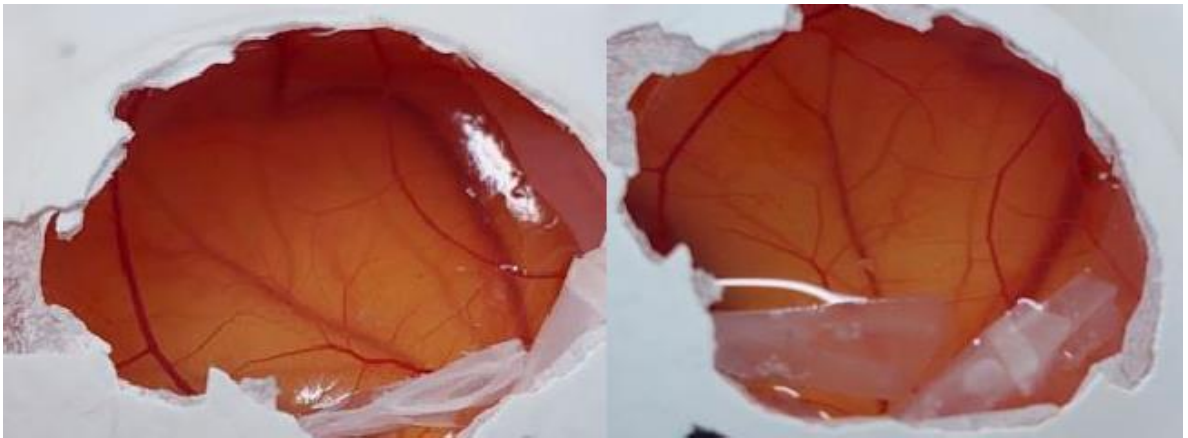
CAPE 0,0775 mg/mL e CITRO 1,25 mg/mL - Hiperemia



ANTES

DEPOIS

CAPE 0,15 mg/mL



ANTES

DEPOIS

ANEXO D - Tabelas dos testes de DPPH e FRAP

DPPH

Absorbâncias e porcentagens de supressão dos volumes da amostra CAPE 0,15 mg/mL.

<i>Volume (μL)</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>
10	0,700	27,54	0,643	31,90	0,715	31,84
20	0,467	51,66	0,454	51,91	0,341	67,49
30	0,333	60,64	0,188	78,88	0,207	76,70
40	0,217	74,35	0,184	79,32	0,189	78,72
50	0,200	76,36	0,203	73,94	0,173	77,68

Absorbâncias e porcentagens de supressão dos volumes da amostra Citronela 2,5 mg/mL.

<i>Volume (μL)</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>
10	0,952	13,06	1,002	1,52
20	0,788	6,14	0,902	8,61
30	0,816	3,09	0,923	6,48
40	0,768	8,79	0,881	10,74
50	0,843	0,12	0,884	10,43

Absorbâncias e porcentagens de supressão dos volumes da amostra DMSO em xantana.

<i>Volume (μL)</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>
10	0,949	4,06	0,990	10,61
20	1,013	11,07	0,981	9,61
30	0,958	5,04	0,995	11,17
40	0,910	0,22	0,948	5,91
50	0,895	1,86	0,947	5,81

Absorbâncias e porcentagens de supressão dos volumes da amostra Clorexidina 0,12%.

<i>Volume (μL)</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>
10	0,845	3,98	0,916	11,16
20	0,810	7,95	0,770	12,50
30	0,808	8,18	0,784	10,91
40	0,857	2,61	0,710	19,32
50	0,767	12,84	0,733	16,70

**Absorbâncias e porcentagens de supressão dos volumes da amostra Citronela
1,25 + CAPE 0,0775 mg/mL.**

<i>Volume (μL)</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>%</i>
10	0,701	13,03	0,779	6,26	0,727	10,25
20	0,653	18,98	0,617	23,45	0,606	25,18
30	0,534	33,75	0,605	24,94	0,530	34,57
40	0,443	45,04	0,490	39,21	0,479	40,86
50	0,454	43,67	0,390	51,61	0,438	45,92
60	0,610	36,46	0,516	45,45	0,576	42,51
70	0,507	47,19	0,515	45,56	0,536	46,51

Pesagens de cada volume analisado das amostras.

<i>Volume (μL)</i>	<i>Pesagens (mg)</i>					<i>Médias (mg)</i>
10	10,00	10,90	11,50	14,90	9,70	11,4
20	19,40	22,00	22,20	25,70	19,20	21,7
30	29,00	33,00	33,20	34,20	28,50	31,58
40	38,60	44,30	42,90	42,70	38,80	41,46
50	48,50	55,30	54,20	52,00	48,70	51,74
60	57,90	65,70	64,20	61,50	58,90	61,64
70	67,80	76,50	73,40	71,10	68,40	71,44

FRAP**Absorbâncias e equivalências de Fe⁺² das amostras.**

<i>Xantana + DMSO</i>	<i>Absorbância</i>	<i>Equivalência de Fe⁺²</i>
<i>10 µL</i>	0,014	0,56
<i>20 µL</i>	0,047	1,37
<i>CAPE 0,15 mg/mL</i>	<i>Absorbância</i>	<i>Equivalência de Fe⁺²</i>
<i>10 µL</i>	0,312	7,86
<i>20 µL</i>	0,592	14,71
<i>Citronela 2,5 mg/mL</i>	<i>Absorbância</i>	<i>Equivalência de Fe⁺²</i>
<i>10 µL</i>	0,17	4,38
<i>20 µL</i>	0,438	10,94
<i>Citronela 1,25 + CAPE 0,0775 mg/mL</i>	<i>Absorbância</i>	<i>Equivalência de Fe⁺²</i>
<i>10 µL</i>	0,355	8,91
<i>20 µL</i>	0,634	15,74
<i>Clorexidina 0,12%</i>	<i>Absorbância</i>	<i>Equivalência de Fe⁺²</i>
<i>10 µL</i>	0,101	2,69
<i>20 µL</i>	0,221	5,63