

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a)
autor(a), o texto completo desta tese
será disponibilizado somente a partir
de 09/09/2024.



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

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 Kazancioglu HO, et al. Effects of caffeic acid phenethyl ester on wound healing in calvarial defects. *Acta Odontol Scand* 2015;73:21-27.
- 34 Kazancioglu 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 Caiassa 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.