



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

DANIELE DE GODOY PENTEADO BRAGADO PUPPIN

**Ação antifúngica e toxicidade do óleo
essencial de *Elionurus muticus* (Capim-limão
brasileiro)**

Piracicaba
2018

DANIELE DE GODOY PENTEADO BRAGADO PUPPIN

**Ação antifúngica e toxicidade do óleo
essencial de *Elionurus muticus* (Capim-limão
brasileiro)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Biologia Buco-Dental, na Área de Microbiologia e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PELA ALUNA DANIELE DE GODOY PENTEADO BRAGADO PUPPIN E ORIENTADA PELO PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING.

Piracicaba

2018

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CAPES

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Heloisa Maria Ceccotti - CRB 8/6403

P969a Puppim, Daniele de Godoy Penteado Bragado, 1983-
Ação antifúngica e toxicidade do óleo essencial de *Elionurus muticus*
(capim-limão brasileiro) / Daniele de Godoy Penteado Bragado Puppim. –
Piracicaba, SP : [s.n.], 2018.

Orientador: José Francisco Hofling.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade
de Odontologia de Piracicaba.

1. Óleos voláteis. 2. Plantas medicinais. 3. Anti-infecciosos. I. Hofling, José
Francisco, 1947-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de
Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Antifungal action and toxicity of the essential oil of *Elionurus muticus* (brazilian lemongrass)

Palavras-chave em inglês:

Oils, Volatile

Plants, medicinal

Anti-infective agents

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Mestra em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

José Francisco Hofling

Denise Madalena Palomari Spolidorio

Marcelo Fabiano Gomes Boriollo

Data de defesa: 11-12-2018

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 11 de Dezembro de 2018, considerou a candidata DANIELE DE GODOY PENTEADO BRAGADO PUPPIN aprovada.

PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

PROF^a. DR^a. DENISE MADALENA PALOMARI SPOLIDORIO

PROF. DR. MARCELO FABIANO GOMES BORIOLLO

A Ata da defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no processo de vida acadêmica do aluno.

AGRADECIMENTOS

À Universidade de Campinas- UNICAMP - Faculdade de Odontologia de Piracicaba e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Buco-Dental na pessoa de sua coordenadora, Profa. Dra. Ana Paula de Souza, pela oportunidade de realização do Curso de Mestrado em Biologia Buco-Dental, área de Microbiologia e Imunologia.

Aos Professores Doutores da área de Microbiologia e Imunologia, Renata de Oliveira Mattos Graner, Rafael Nobrega Stipp e José Francisco Höfling, em especial ao meu orientador, José Francisco Höfling, por me dar a oportunidade como aluna do curso de Mestrado, dar todo suporte necessário e por me apoiar nesta minha busca de conhecimento científico e obtenção do título de Mestre na área de Microbiologia e Imunologia.

*Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA/UNICAMP, na pessoa da Prof^a. Dr^a. Mary Ann Foglio, pela análise cromatográfica do óleo essencial de *Elionurus muticus*.*

À equipe da Coordenadoria de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP, especialmente à coordenadora Prof^a. Dra. Karina Gonzales Silverio Ruiz e aos funcionários. Érica Alessandra Pinho Sinhoret e Leandro Vigano.

Aos professores membros efetivos da banca examinadora, José Francisco Höfling, Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, Denise Madalena Palomari Spolidorio, e aos membros suplentes Paula Cristina Anibal e Natália Leal Vizoto. Obrigada pela parceria científica, disponibilidade e pelos preciosos ensinamentos e correções deste trabalho.

Às amigas e pós-graduandas da área de Microbiologia e Imunologia, e Thaís Oliveira Rossini, Simone Nataly Busato de Feiria e Giovana Cláudia Boni que vivenciaram de perto meus momentos de mestrado, sempre me incentivando e me dando suporte. Agradeço em especial à Thaís Oliveira Rossini, pelo sentimento de irmã de coração construído neste período e que levarei para a vida toda!

Aos pós-graduandos e demais pesquisadores da Área de Microbiologia e Imunologia pela amizade compartilhada durante o período de pós-graduação

principalmente ao Jeferson da Silva Júnior, Rodrigo Bassi, Janaína Priscila Barbosa, Filipe Matheus Cardoso da Silva, Marcelle Marie Buso Ramos, Lívia de Araújo Alves, Felipe Joia, Talita Graziano, Josiane Neres, Vanessa Cardoso, Paula Anibal, Gayan Kanchana Wijesinghe e Flavia Maia. Em particular a Janaína Priscila Barbosa, Paula Cristina Anibal e Marcelle Marie Buso Ramos pelo suporte técnico e incentivo a minha pesquisa.

Aos amigos e técnicos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Anderson Laerte Teixeira e Valéria Franco, e à secretária da Área de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, Ivete Ribeiro.

Aos parentes amados que sempre estão presentes na minha vida: meu amado marido Luis Antônio Puppín, minha mãe Tania Maria Camargo de Godoy Penteado Bragado, meu pai Ronaldo Caro Bragado, meu irmão Daniel Godoy Penteado Bragado, minha sogra Beatriz Puppín, minhas amigas Mariana Sayuri, Amanda e Claudia Pelligrinotti, minhas cunhadas Verginia e Aparecida Puppín. Obrigada por todo o apoio!

Ao meu falecido avô, Sergio Arantes de Godoy Penteado, obrigada pela inspiração e pelo conforto de ter existido.

À Microbiologia e à Imunologia, ciências apaixonantes que completam minha existência e que situam minha função neste mundo.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

E aos que de alguma forma contribuíram e me auxiliaram na realização dessa dissertação de mestrado.

"Porque em verdade vos afirmo que, se alguém disser a este monte: Ergue-te e lança-te no mar, e não duvidar no seu coração, mas crer que se fará o que diz, assim será com ele"

Marcos 11:23

"Acredito que todos os fenômenos complicados podem ser explicados por princípios científicos mais simples."

Linus Pauling

RESUMO

O aumento de infecções fúngicas associado à seleção de fungos resistentes tem levado os pesquisadores à procura de novas substâncias ou componentes bioativos como alternativas terapêuticas. Extratos de óleos essenciais de plantas com potencial diversificado, tem sido uma alternativa de estudos com o objetivo clínico na área da Saúde. *Elionurus muticus* é popularmente utilizado no tratamento de diversas doenças, incluindo aquelas causadas por fungos. O objetivo deste estudo foi avaliar as propriedades antifúngicas e tóxicas do *Elionurus muticus*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram avaliadas visualmente de acordo com a CLSI. Os biofilmes de *Candida albicans* foram quantificados por XTT e avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A atividade tóxica foi testada por sulforrodamina B em células Hacat e pela taxa de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella*. O óleo essencial de *Elionurus muticus* apresentou CIM de 31,2 µg/mL à 125 µg/mL e CFM de 62,5 µg/mL a 500 µg/mL. Houve diminuição da atividade metabólica do biofilme em formação e maduro em relação ao controle nas concentrações de 1000 à 125 µg/mL, porém não apresentando significância estatística para a concentração de 125 µg/mL para o biofilme maduro. Alterações morfológicas como baixo volume citozólico, irregularidades na superfície celular e diminuição da espessura de hifas e leveduras foi observado nas concentrações de 312,5 e 1250 µg/mL no biofilme em formação e maduro. As concentrações de 125 à 16000 µg/mL apresentaram crescimento celular acima de 50% de células Hacat. Após 72h do tratamento com concentrações de 125 à 1250 µg/mL observou-se que todas as larvas de *Galleria mellonella* testadas permaneceram vivas, sendo assim, a taxa de sobrevivência foi de 100%. O óleo essencial de *Elionurus muticus* possui atividade antifúngica contra espécies testadas de *Candida* no estado planctônico e em biofilme maduro de *C. albicans* em concentrações que não demonstram toxicidade *in vitro* em células Hacat e *in vivo* em larvas de *Galleria mellonella*.

Palavras-chave: Óleos voláteis. Plantas medicinais. Anti-infecciosos.

ABSTRACT

The increase in fungal infections associated with the selection of resistant fungi has led researchers to look for new bioactive substances or components as therapeutic alternatives. Extracts of plant essential oils with diversified potential have been an alternative to clinical studies in the area of Health. *Elionurus muticus* is popularly used in the treatment of various diseases, including those caused by fungi. The objective of this study was to evaluate the antifungal and toxic properties of *Elionurus muticus*. Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) were visually assessed according to CLSI. The biofilms of *Candida albicans* were quantified by XTT and evaluated by Scanning Electron Microscopy (SEM). Toxic activity was tested by sulforhodamine B in Hacat cells and by the survival rate of *Galleria mellonella* larvae. The essential oil of *Elionurus muticus* had MIC of 31.2 µg / mL at 125 µg / mL and MFC of 62.5 µg / mL at 500 µg / mL. There was a decrease in the metabolic activity of the biofilm in formation and mature in relation to the control in the concentrations of 1000 to 125 µg / mL, but not presenting statistical significance for the concentration of 125 µg / mL for the mature biofilm. Morphological changes such as low cytocholic volume, irregularities on the cell surface and decrease in the thickness of hyphae and yeasts were observed in the concentrations of 312.5 and 1250 µg / mL in the biofilm in formation and mature. Concentrations of 125 to 16000 µg / mL showed cell growth above 50% of Hacat cells. After 72h of the treatment with concentrations of 125 to 1250 µg / mL it was observed that all the *Galleria mellonella* larvae tested remained alive, thus, the survival rate was 100%. The essential oil of *Elionurus muticus* has antifungal activity against *Candida* species in the planktonic state and mature *C. albicans* biofilm at concentrations that do not demonstrate in vitro toxicity in Hacat cells and in vivo in *Galleria mellonella* larvae.

Key works : Volatile oils. Medicinal plants. Anti-infectives.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS – Acquired Immunodeficiency Syndrome

ATC – Ácido Tricloroacético

ATCC – *American Type Culture Collection*

CBS – *Centraal Bureau voor Schimmelcultures*

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CG/EM – Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CLSI – *Clinical Laboratorial Standart Investigation*

CPQBA – Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas.

Hacat – *Aneuploid Immortal Keratinocyte Cell Line*

HIV – Human Immunodeficiency Virus

IZ – *Instituto Zimotécnico-ESALQ/USP*

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg – miligramas

mL – mililitros

PBS – Phosphate Buffered Saline

PS – Poliestileno

RPMI –1640 - Meio de cultura desenvolvido por *Roswell Park Memorial Institute*

SDA – *Sabouraud Dextrose Agar*

SFB – Soro Fetal Bovino

SRB – Sulforrodamina B

UFC – Unidade Formadora de Colônias

XTT – 2,3-Bis(2-methoxy-4-nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide

YNB – *Yeast Nitrogen Base*

YPD – *Yeast Peptone Dextrose*

µg – microgramas

µL – microlitros

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1 -	Atividade metabólica do biofilme em formação de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i>	31
Gráfico 2 -	Atividade metabólica do biofilme maduro de <i>C. albicans</i> exposto ao óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i>	32
Figura 1 -	Imagens de M.E.V. do biofilme em formação tratado e não tratado de <i>C. albicans</i> ATCC MYA 2876 com o óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> .	34
Figura 2 -	Imagens de M.E.V. do biofilme maduro de <i>C. albicans</i> ATCC MYA 2876 tratado e não tratado com o óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> .	36
Gráfico 3 -	Toxicidade <i>in vitro</i> do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> em células Hacat	37
Gráfico 4 -	Toxicidade <i>in vivo</i> do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> em larvas de <i>Galleria mellonella</i>	38
Gráfico 5 -	Apresentação dos picos cromatográficos (CG/EM) do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> .	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Compostos do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> identificados por Cromatografia Gasosa em aparelho de Espectrometria de Massas (CG/EM)	28
Tabela 2 -	Perfil de susceptibilidade do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i>	30
Tabela 3 -	Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> através de Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massas (CG/EM).	50

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 <i>CANDIDA</i> SPP. E CANDIDÍASES	17
2.2 BIOFILMES DE <i>CANDIDA</i> SPP.	18
2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>ELIONURUS MUTICUS</i>	18
2.4 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS	19
3 PROPOSIÇÃO	20
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 ÓLEO ESSENCIAL	21
4.2 CROMATOGRAFIA	21
4.3 CEPAS DE <i>CANDIDA</i> SPP.	22
4.4 DILUIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	22
4.5 ENSAIO DE SUCEPTIBILIDADE DAS ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i>	22
4.6 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL NOS BIOFILMES DE <i>CANDIDA ALBICANS</i>	23
4.6.1 Preparo do inóculo	24
4.6.2 Biofilme em formação	24
4.6.3 Biofilme Maduro	24
4.6.4 Quantificação colorimétrica do biofilme (XTT)	25
4.6.5 Análise estatística do biofilme	25
4.6.6 Análise do efeito dos óleos essenciais no biofilme de <i>Candida</i> através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)	25
4.7 TOXICIDADE <i>IN VITRO</i> : CÉLULAS HACAT	26
4.8 TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> : <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	27

5 RESULTADOS	28
5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA	28
5.2 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE DAS ESPÉCIES DE <i>CANDIDA</i>	28
5.3 ENSAIOS DO BIOFILME DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> ATCC MYA 2876	31
5.3.1 Ensaio XTT	31
5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	32
5.4 TOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>ELIONURUS MUTICUS</i> EM CÉLULAS HACAT	37
5.5 TOXICIDADE <i>IN VIVO</i> DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>ELIONURUS MUTICUS</i> EM LARVAS DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i>	38
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44
ANEXOS	49
ANEXO 1 - Apresentação dos picos cromatográficos (CG/EM) do óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> .	49
ANEXO 2 - Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de <i>Elionurus muticus</i> através de Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massas (CG/EM).	50

1 INTRODUÇÃO

As espécies de *Candida* são considerados microrganismos comensais em vários órgãos na maioria dos indivíduos saudáveis, mas podem tornar-se patogênicas quando as defesas do hospedeiro são violadas ou sob a condição de disbiose microbiana (Braunsdorf e Leibundgut-Landmann, 2018). Embora a espécie mais frequentemente isolada seja a *C. albicans*, na última década, o número de infecções causadas por outras espécies de *Candida* aumentou significativamente, como as candidíases causadas por *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. krusei* (Rossoni et al, 2017).

As infecções causadas por espécies de *Candida* podem envolver a formação de biofilmes resultando em infecções superficiais e sistêmicas. Esses biofilmes podem ocorrer em superfícies bióticas e abióticas, como dispositivos médicos, próteses, desfibriladores, cateteres urinários, vasculares e dispositivos cardíacos (Cavalheiro e Texeira, 2018).

As opções terapêuticas para o tratamento dessas infecções causadas por *Candida* são principalmente os antifúngicos do tipo azóis, polienos e equinocandinas. A utilização clínica destes agentes tem sido limitada, devido ao aumento da resistência das espécies de *Candida* à estes medicamentos, contribuindo com o aumento das taxas de morbidade e mortalidade (Romo et al, 2017).

Devido à resistência de espécies de *Candida* aos fármacos convencionais somado ao aumento das infecções, pesquisas com plantas medicinais tem sido uma alternativa na descoberta de novos biocomponentes para diversas aplicações na medicina popular. A utilização de óleos essenciais extraídos de diversos tipos de plantas, apresentaram diversas indicações, entre elas as ações antissépticas, antifúngicas e antibacterianas (Pinto et al, 2017).

Nesse contexto, o gênero *Elionurus*, é utilizado popularmente no tratamento de diversas infecções. Este gênero é encontrado na África, Ásia, América do Norte e América do Sul. Possui taxonomia complexa com grande variabilidade, porém ainda pouco esclarecida, outra dificuldade taxonômica diz respeito a

sinonímias. As sinonímias de *E. muticus* englobam as espécies *E. rostratus*, *E. latiflorus* e *E. adustrus* (Füller, 2010).

Elionurus muticus é uma gramínea do pampa brasileiro, conhecido como capim-limão brasileiro. Este, tem despertado bastante interesse no ramo fitoquímico. Apresenta atividade antioxidante relacionada ao conteúdo de seus compostos fenólicos. Destaca-se ainda, por conter propriedades antissépticas. Produz óleo essencial em toda sua extensão: tanto na parte aérea, folhas e inflorescências, quanto nas raízes. Entretanto, tanto a composição quanto o rendimento são variáveis de acordo com a região de cultivo e a sazonalidade. O óleo essencial de *Elionurus muticus* pode conter alfa-pineno, mirceno, limoneno, eucaliptol, ocimeno-cis-beta, linanol, cis-fotocitral, trans-fotocitral, citronelal, neral, geraniol, geranial, acetato de bornil, alfa-ilangeno, acetato de geranil, beta- cariofileno, Ar-curcumene, zingiberene, elemol, trans-nerolidol, óxido de cariofileno, 10-epi-gama-eudesmol e isospathulenol (Füller, 2013).

Estudos que objetivam ampliar os conhecimentos farmacológicos sobre plantas potencialmente medicinais são importantes no sentido de se melhorar o entendimento sobre as substâncias e biocomponentes presentes nos extratos e óleos essenciais com ênfase ao seu uso como fitoterápicos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos avaliar as propriedades antifúngicas e citotóxicas do *Elionurus muticus*. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) foram avaliados visualmente de acordo com a CLSI. O biofilme de *Candida albicans* foi quantificado por XTT e avaliados por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). A atividade citotóxica foi quantificada por sulforrodamina B em células Hacat e pela taxa de sobrevivência de larvas de *Galleria mellonella*.

As qualificações para se obter um bom antifúngico dependem de certos fatores como eficácia e baixa toxicidade. Os resultados obtidos nesta pesquisa demonstraram potencial antifúngico contra as cepas de *Candida* e nos testes com o biofilme de *Candida albicans*, assim como também demonstraram baixa toxicidade, no que se refere às células Hacat e as larvas de *Galleria mellonella*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.2 *CANDIDA* SPP. E CANDIDÍASES

A candidíase é um termo amplo que se refere a infecções de mucosas e órgãos causadas por fungos do gênero *Candida* (Pappas et al., 2018).

Globalmente, a cada ano, 300 milhões de pessoas de todas as idades sofrem com graves infecções fúngicas e mais de 1,5 milhão dessas pessoas morrem como resultado de tais doenças. Segundo as últimas estimativas da Organização Mundial de Saúde, esta taxa de mortalidade excede atualmente a de outras doenças infecciosas graves, como a malária (445.000 mortes em 2016), a hepatite B (887.000 mortes em 2015) e a AIDS (1 milhão de mortes em 2016). A candidíase invasiva afeta mais de 700.000 pessoas em todo o mundo a cada ano e, com uma taxa de mortalidade inaceitavelmente superior a 40%, é a causa de mais de 280.000 mortes (Scordino et al., 2018). A incidência dessas infecções tem aumentado nos últimos anos devido ao uso generalizado de antimicrobianos de amplo espectro e do crescente número de indivíduos infectados pelo HIV e imunocomprometidos (Neppelenbroek et al., 2014).

Apesar do predomínio de *Candida albicans*, outras espécies *não-albicans* como *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Candida dubliniensis*, *Candida parapsilosis*, *Candida glabrata* e *Candida krusei* estão emergindo como colonizadores e patógenos que podem causar infecções superficiais e sistêmicas (Pappas et al., 2018).

A gravidade destas infecções está relacionada a patogenicidade das espécies presentes. A patogenicidade das espécies de *Candida* depende de vários fatores de virulência, entre eles, capacidade de aderência às células hospedeiras, secreção de enzimas degradativas, pleomorfismo e a capacidade de formar biofilme (Portela et al., 2017; Cauchie et al., 2017).

2.2 BIOFILMES DE *CANDIDA* SPP.

Um dos fatores de virulência que contribuem para infecções de espécies de *Candida* é a formação de biofilmes. Nos biofilmes as células fúngicas geralmente estão incorporadas em uma matriz extracelular autoproduzida contendo proteínas, carboidratos, fósforo e hexosaminas. As vantagens da formação de um biofilme são: proteção às células de *Candida* contra fármacos e outros microrganismos; remoção dos produtos metabólicos nocivos; favorecimento da aquisição e da transformação de nutrientes; facilitação da comunicação através da secreção de moléculas sinalizadoras em uma população (*quorum sensing*); produção de proteases secretadas para aquisição de nutrientes e degradação das proteínas hospedeiras (Lim et al., 2012; Cauchie et al., 2017).

A matriz de biofilme de *C. albicans* é complexa e possui constituintes polissacarídicos: α -manana, β -1,6 glucano e β -1,3-glucano. Pelo menos cinco espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*) são capazes de formar biofilmes e também têm sido investigados *in vitro*. Entre estes, *C. albicans* e *C. parapsilosis* mostraram a maior capacidade para formar biofilmes (Cauchie et al., 2017).

2.3 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ELIONURUS MUTICUS*

O óleo essencial do *Elionurus muticus* pode conter alfa-pineno, mirceno, limoneno, eucaliptol, cis-beta-ocimeno, linalol, cis-fotocitral, trans-fotocitral, citronelal, neral, geraniol, geranial, acetato de bornil, alfa-ylangeno, acetato de geranila, beta-cariofileno, ar-curcúmeno, zingibereno, elemol, trans-nerolidol, óxido de cariofileno, 10-epi-gama-eudesmol e isopatulenol. (Füller, 2013).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, de uma maneira geral, pode estar relacionada ao conjunto de substâncias em sua composição, e não somente a cada um dos compostos majoritários. Portanto, tanto a composição química quanto a ação antimicrobiana podem variar em uma mesma planta devido a fatores ligados à biologia (genética, nutrição e fase de desenvolvimento), além de outros fatores (local, condições climáticas e tipo de solo) (Lima et al., 2014).

Nessa linha de investigação, a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Elionurus muticus* tem sido demonstrada em diversos artigos contra espécies de *Candida* (Sabini et al.,2006; Chagonda e Fungirayi, 2016), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* (Moreno et al., 2013) , *Penicillium expansum*, *Botrytis cinera*, *Botrytis allii* (Füller, 2013), *Staphylococcus Coagulase-Negativo*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus uberis* e *Pseudomonas aeruginosa* (Bohm et al., 2012; Lambrecht Gonçalves et al, 2013).

2.4 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais podem ser consideradas tóxicas causando diversas reações, desde alergias na pele e mucosas, distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e em alguns casos até a morte. Os fatores que influenciam a toxicidade estão relacionados com a composição química vegetal, a dose utilizada e a forma de uso (Campos et al.,2016).

Existem vários modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* utilizados para avaliação da toxicidade das substâncias. Geralmente os estudos relacionados a toxicidade iniciam-se com modelos experimentais *in vitro* e depois com modelos experimentais *in vivo* . A triagem celular *in vitro* fornece um método custo-efetivo. Experimentos de cultura de células são adequados para desenvolver modelos mecanicistas para informar a toxicidade do composto. As células epiteliais entram diretamente em contato com substâncias do meio externo. Assim, o resultado de efeitos citotóxicos em uma linhagem celular derivada da pele humana (Hacat) pode ser útil para melhor compreensão de mecanismos tóxicos e riscos potenciais para a saúde humana (Colombo et al., 2017).

Além dos ensaios *in vitro* utilizando cultura de células, tem crescido o interesse em usar insetos como modelos alternativos substituindo modelos animais convencionais. A *Galleria mellonella* é um lepidóptero (Pyralidae) que fornece vantagens importantes como modelo de estudo. Larvas de *G. Mellonella* possuem um custo baixo de aquisição e os resultados podem ser obtidos dentro de 48 horas e um grande número de insetos que podem ser inoculados em um curto período de tempo (Kelly e Kavanagh, 2011).

3 PROPOSIÇÃO

Com base na literatura disponível e experiências anteriores de nosso laboratório de pesquisa na FOP/UNICAMP nessa linha de investigação, o objetivo do presente estudo foi avaliar os efeitos antifúngicos do óleo essencial de *Elionurus muticus* em espécies de *Candida* em estado planctônico e no biofilme de *Candida albicans*, bem como a toxicidade em células Hacat e larvas de *Galleria mellonella*.

Objetivos específicos do estudo envolvem o óleo essencial de *Elionurus muticus* com o propósito de:

- a) Determinar a composição fitoquímica por Cromatografia Gasosa em aparelho com Espectrometria de Massas (CG/EM);
- b) Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) em cepas padrão *Candida* spp.;
- c) Testar a atividade em diferentes concentrações no biofilme em formação e maduro de *Candida albicans* (ATCC MYA 2876);
- d) Detectar possíveis modificações morfológicas no biofilme de *Candida albicans* (ATCC MYA 2876) através da Microscopia Eletrônica de Varredura;
- e) Testar o potencial de toxicidade em células epiteliais humanas (Hacat);
- f) Avaliar o potencial de toxicidade em larvas de *Galleria mellonella*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *Elionurus muticus* (Lote: 002) foi adquirido comercialmente da empresa HARMONIA NATURAL, Canelinha – SC, Brasil. (Nomeado por *Elionurus latiflorus*, uma das suas sinonímias).

4.2 CROMATOGRAFIA

O óleo essencial de *Elionurus muticus* passou por análise de qualificação e quantificação dos compostos presentes na amostra pela técnica de cromatografia gasosa (Anexo 1). Este ensaio foi realizado no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas – CPQBA da Universidade Estadual de Campinas – Unicamp, localizado na rua Alexandre Cazelatto, 999 – Vila Betel, Paulínia- SP – CEP: 13148-218.

Foi utilizado cromatógrafo gasoso Hewlett-Packard 5890 série II, equipado com detector seletivo de massas Hewlett-Packard 5971, injetor split/splitless, utilizando-se uma coluna capilar HP-5(25m x 0,2 mm x 0,33µm). Temperaturas : injetor =220°C, detector =280°C, coluna = 60°C, 3 °C.min⁻¹, 240 °C (7 min). A vazão do gás de arraste (He super seco) foi igual 1,0 ml. Min⁻¹.

A análise dos dados da CG foi levada a efeito de acordo com a equação de *Van den Dool e Kratz* para a obtenção do Índice de Retenção seguida de comparação dos índices de retenção e picos cromatográficos dele obtidos com os encontrados na literatura.

$IR = [(T_s - T_{cn-1}) / (T_{cn} - T_{cn-1})] \times 100 + 100 \cdot c_{n-1}$, onde:

IR= índice de retenção;

T_s= tempo de retenção da substância analisada;

T_{cn}= tempo de retenção do n-alcano que elui após a substância analisada;

T_{cn-1}= tempo de retenção do alcano que elui antes da substância analisada;

C_{n-1}= número do alcano que elui antes da substância analisada

4.3 CEPAS DE *CANDIDA* SPP.

As cepas padrão do gênero *Candida* utilizadas foram: *C. albicans* (ATCC 90028, ATCC MYA 2876 e CBS 562), *C. guilliermondii* (CBS 566), *C. krusei* (CBS 573), *C. utilis* (CBS 5609), *C. rugosa* (IZ 12), *C. lusitaniae* (IZ 06), *C. glabrata* (IZ 07), *C. dubliniensis* (CBS 7987), *C. parapsilosis* (CBS 604), *C. tropicalis* (CBS 94).

4.4 DILUIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *Elionurus muticus* foi diluído em solução Tween 80 (0,05%) e meio de cultura.

4.5 ENSAIO DE SUCEPTIBILIDADE DAS ESPÉCIES DE *CANDIDA*

O óleo essencial foi testado quanto a sua atividade antifúngica sobre diferentes espécies *Candida* pela técnica de microdiluição em caldo para determinação da CIM (Concentração Inibitória Mínima) seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 (CLSI, 2008).

O inóculo foi ajustado em solução salina (NaCl 0,9%), equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL em espectrofotômetro (0,08 - 0,1 abs, 530nm). Este foi padronizado a $2,5 \times 10^3$ por diluições de 1:10 em solução salina (0,9%) e 1:20 em meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA-ALDRICH®).

Em uma microplaca PS (poliestireno) esterilizada de 96 poços fundo chato (GLOBAL PLAST®), foram depositados 100 µL de meio de cultura RPMI 1640. Em seguida, adicionou-se na primeira coluna 100 µL do óleo essencial de *Elionurus muticus* diluído. Posteriormente, preparou-se diluições seriadas de forma que os poços apresentassem concentrações de 2000 à 7,8 µg/mL. Após o processo de diluição seriada foram adicionados 100 µL do inóculo ajustado. Foram realizados controles positivos e negativos:

- Grupo de crescimento 1: meio de cultura e inóculo, para observação do crescimento da levedura;

- Grupo de crescimento 2: meio de cultura, Tween 80 e inóculo, com a finalidade de observar possíveis efeitos tóxicos do diluente para a levedura;
- Grupo de esterilidade 1: somente meio de cultura, para observar possíveis contaminações;
- Grupo de esterilidade 2: meio de cultura, óleo essencial e diluente, finalidade de observar possíveis contaminações no processo de microdiluição.

A microplaca foi incubada por 24 horas à 37°C em estufa de aerobiose. Através da leitura visual da microplaca, foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM). Foram realizados três ensaios independentes.

Após determinar a CIM, foi determinada a Concentração Fungicida Mínima (CFM) por meio da transferência de 10 µL de cada compartimento da microplaca do ensaio de CIM para uma placa de SDA (HIMEDIA®) que foi incubada em estufa de aerobiose a 37°C por 24 horas, de acordo com o protocolo com modificações de Gullo et al. (2012). A CFM foi determinada como a menor concentração do óleo essencial que não apresentou o crescimento de colônias.

A interpretação dos dados do perfil de susceptibilidade do óleo essencial foi determinado conforme Sardi et al. (2017). Portanto, foi estabelecido por meio da relação CFM/CIM, onde os valores menores que 4 exibem perfil fungicida e os valores maiores ou iguais a 4 exibem perfil fungistático.

4.6 EFEITO DO ÓLEO ESSENCIAL NOS BIOFILMES DE *CANDIDA ALBICANS*

O óleo essencial de *Elionurus muticus* foi testado em biofilme de *C. albicans* (ATCC MYA 2876) em formação (2 horas) conforme descrito por Silva et al. (2010) com adaptações e em biofilme maduro (24 horas) conforme descrito por Pierce et al. (2008).

4.6.1 Preparo do inóculo

Para ambos os biofilmes, as células de *Candida albicans* ATCC MYA 2876 foram reativadas em meio de cultura SDA por 24 horas à 37° C em estufa de aerobiose. Após crescimento, as células foram incubadas *overnight* em meio de cultura YPD (Accumedia®) sob agitação de 30 rpm à 30°C.

Uma alíquota de 7 mL do inóculo foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos e lavada 2 vezes com PBS 1x, o *pellet* obtido na última centrifugação foi ressuspenso em 7 mL de meio de cultura YNB (DIFCO®). Desta suspensão celular resultante foi preparada a diluição de 1:100 e as células foram contadas em câmara de Neubauer em microscópio óptico (aumento de 400x) para ajuste do inóculo de trabalho com uma concentração final de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

4.6.2 Biofilme em formação

Em uma microplaca PS esterilizada de 96 poços fundo U (KASVI®) foram depositados 100 µL de inóculo ajustado. As células foram incubadas em incubador de microplacas por 2 horas sob agitação 100 rpm a 37°C. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e adicionados 100 µL do óleo essencial em concentrações decrescentes a partir de 1000 µg/mL a 125 µg/mL. Depois de adicionado as concentrações do óleo essencial, incubou-se por 24 horas a 37°C em estufa de aerobiose.

4.6.3 Biofilme Maduro

Em uma microplaca PS esterilizada de 96 poços fundo U (KASVI®) foram depositados 100 µL de inóculo ajustado. As células foram incubadas à 37° C por 24 horas em estufa de aerobiose. Após o período de incubação, a placa foi lavada 3 vezes com PBS e adicionados 100 µL do óleo essencial em concentrações decrescentes a partir de 1000 µg/mL a 125 µg/mL. Depois de adicionado as concentrações do óleo essencial, incubou-se por 24 horas a 37°C em estufa de aerobiose.

4.6.4 Quantificação colorimétrica do biofilme (XTT)

Após 24 horas de incubação na presença do óleo essencial foram feitas 3 lavagens com PBS para a remoção das células fracamente aderidas do biofilme maduro e em formação, e do óleo essencial. Os biofilmes aderidos às placas foram então corados com 80 µl de XTT (SIGMA-ALDRICH), para se determinar a viabilidade celular dos biofilmes tratados. O XTT modifica sua coloração de amarela para laranja em resposta à uma oxirredução sofrida na respiração celular. Após incubação por 2h a 37°C com restrição de luz, a seguir, a viabilidade celular foi mensurada por densidade óptica em espectrofotômetro de microplaca à 490nm. Os ensaios foram feitos em três experimentos independentes. Os valores de absorbância do biofilme tratado foram subtraídos dos valores de absorbâncias do controle para obter a porcentagem de atividade metabólica do biofilme (Pierce et al, 2008).

4.6.5 Análise estatística do biofilme

Para as avaliações comparativas foi utilizada a análise estatística ANOVA um critério, variação *Dunnett*, bilateral ($p < 0,01$), (Programa Biostat 5.0), onde as médias das concentrações e do controle foram comparadas entre si.

4.6.6 Análise do efeito dos óleos essenciais no biofilme de *Candida* através do Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

Para a análise do efeito dos óleos essenciais no biofilme de *Candida albicans* ATCC MYA-2876 por MEV, o inóculo foi ajustado de acordo com o item 4.6.1, resultando em uma concentração de 1×10^6 UFC/mL. A partir da suspensão final de células, o biofilme de *C. albicans* foi produzido em lâminas de cultura (BD Falcon). Para o ensaio de biofilme em formação, a lâmina foi incubada a 37°C, com agitação a 75 rpm em agitador de microplacas durante 90 min. . Após o período de incubação, a lâmina lavada 3 vezes com PBS. Em seguida, foi adicionado as concentrações de 125 µg/mL, 312,5 µg/mL, 1250 µg/mL do óleo essencial de *Elionurus muticus*, e foi incubado em estufa aeróbica a 37°C por 24 horas. Para o biofilme maduro, a suspensão celular foi incubada a 37°C por 24 horas e após o período de incubação, foi feita a lavagem com PBS, e em seguida, foram adicionados às concentrações de 125 µg/mL, 312,5 µg/mL, 1250 µg/mL do óleo essencial de *Elionurus muticus* e

incubado novamente por mais 24 horas. Após o período de incubação, foi retirado o meio de cultura e o biofilme fixado em glutaraldeído (2,0%) por 30 minutos, seguido de secagem em temperatura ambiente. Os espécimes foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos. Os espécimes foram secos, metalizados e armazenados em dessecador para posterior observação em MEV (JEOL, JSM 5600LV, Japão). Apenas amostras de levedura foram adicionadas ao controle.

4.7 TOXICIDADE *IN VITRO* : CÉLULAS HACAT

As células epiteliais utilizadas para este ensaio são da linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizada não transformadas denominada Hacat. Estas células foram gentilmente doadas pelo Prof. Dr. Ricardo Della Coletta, da Área de Patologia (FOP/UNICAMP), as quais foram cultivadas na presença do óleo essencial para determinar se o mesmo apresentava efeito tóxico sobre elas.

O ensaio de citotoxicidade em células Hacat foi feito de acordo com Vichai & Kirtikara (2006) com modificações. O ajuste de inóculo foi feito através da contagem de células na câmara de Neubauer para obtenção de um valor de $1,9 \times 10^4$ células/mL. As células foram cultivadas com RPMI + 10% de SFB em placas de 96 poços fundo chato, próprias para cultivo celular (KASVI®) e incubadas a 37°C em estufa de CO₂ (5%) por 24h. Após 24h, 100 µl de óleo essencial de *Elionurus muticus* foi adicionado em concentrações de 125 µg/ml a 16000 µg/ml e incubadas por 24h a 37°C em estufa de CO₂ (5%). A determinação das concentrações do óleo essencial foi feita através da CIM e concentrações superior a dez vezes a CIM. Após esse período, as células foram fixadas com 50 µl de Ácido Tricloroacético (TCA) (SYNTH®) a 50% e incubadas por 1h a 4°C. Na sequência, as placas foram lavadas com água destilada (4x) e secas em temperatura ambiente. Após secas, foram coradas com 100 µl da solução de Sulforrodamina B (SRB) (SIGMA-ALDRICH®) 0,4% por 1 hora a 4°C.

Após a incubação as placas foram lavadas com Ácido Acético 1% (SYNTH®) para retirada de ligações inespecíficas do corante e das células não aderidas e foram secas novamente à temperatura ambiente. Após secas, foram adicionados 100 µl de Trizma Base (SIGMA-ALDRICH®) para a ressuspensão do

corante anteriormente ligado às proteínas de superfície celular. A leitura das placas foi feita em Espectrofotômetro de Microplaca (510nm) para medir a densidade óptica. A absorbância foi expressa em valores numéricos de porcentagem em relação ao grupo controle. Foi utilizado como índice CC50 (crescimento celular 50), como descrito previamente por Endo et al. (2010). Os ensaios foram feitos em três experimentos independentes.

4.8 TOXICIDADE *IN VIVO*: *GALLERIA MELLONELLA*

Todo o ciclo de vida da *Galleria Mellonella* foi realizado na área de Farmacologia (FOP/UNICAMP) sob a supervisão do Prof. Dr. Pedro Luiz Rosalen, ao qual gentilmente cedeu as larvas em seu último estágio para efetivação da avaliação da toxicidade *in vivo* do óleo essencial de *Elionurus muticus*.

O ensaio de toxicidade das larvas de *Galleria mellonella* foi descrito por Scorzoni et al. (2013) com modificações. Para cada concentração testada do óleo essencial e o controle foram usadas 10 larvas. As larvas foram pesadas (0,3-0,5 g), alocadas em placas de Petri e incubadas a 37°C no escuro na noite anterior ao experimento. Foram excluídas as larvas com alterações de cor, ou seja, manchas escuras ou com melanização aparente. A morte das larvas foi monitorada por inspeção visual da cor (marrom - marrom escuro) e pela falta de movimento após o toque.

Antes de qualquer procedimento, a pró-pata foi previamente lavada com etanol 70%. Aplicou-se 10 µL da suspensão de várias concentrações do óleo essencial (125 – 12500 µg/mL) no hemocele através da última pró-pata esquerda das larvas usando a seringa de Hamilton de 1 ml. A determinação destas concentrações foi seguida do valor da CIM até dez vezes o valor da CIM. Após a inoculação, as larvas foram incubadas à 37°C e a morte foi monitorada por 72 horas.

5 RESULTADOS

5.1 CROMATOGRAFIA GASOSA

A análise cromatográfica do óleo essencial detectou uma relação de compostos diversos e seus percentuais em uma amostra de 100 µl de óleo. O composto mais abundante foi o citronelal, com 87,27%, conforme demonstrado pela Tabela 1.

Tabela 1: -Compostos do óleo essencial de *Elionurus muticus* identificados por Cromatografia Gasosa em aparelho de Espectrometria de Massas (CG/EM).

COMPOSTOS	%
NÃO IDENTIFICADO	0,23%
CINEOLE <1,8>	0,64%
CITRONELLAL	87,27%
ISOPULEGOL	2,91%
CITRONELLOL	7,73%
DIHYDROCITRONELLOL ACETATE	0,44%
CITRONELLYL ACETATE	0,40%
CARYOPHYLLENE <(Z-)>	0,39%

5.2 ENSAIO DE SUSCEPTIBILIDADE DAS ESPÉCIES DE *CANDIDA*

O óleo essencial foi testado contra cepas padrão de *Candida* spp. a fim de se determinar a concentração inibitória mínima pela técnica de microdiluição em caldo. Os dados demonstraram atividade inibitória em concentrações de 31,2 µg/mL a 125 µg/mL para o óleo essencial de *Elionurus muticus*, como mostrado na Tabela 2.

Após a determinação da CIM, utilizou-se uma alíquota do ensaio de susceptibilidade para determinar a concentração fungicida mínima (CFM) contra cepas padrão de *Candida* spp. O óleo essencial de *E. muticus* apresentou ação antifúngica em concentrações variando de 62,5 µg/mL a 500 µg/mL, conforme mostra a Tabela 2.

A interpretação de dados do perfil de susceptibilidade do óleo essencial foi estabelecido de acordo com a relação CFM/CIM, onde os valores menores que 4 exibem perfil fungicida e os valores maiores ou iguais a 4 exibem perfil fungistático. O óleo essencial de *Elionurus muticus* mostrou perfil fungistático para *C. parapsilosis* CBS 604, *C. krusei* CBS 573 e *C. utilis* CBS 5609 nas concentrações de CIM e CFM : 31,2 e 125 µg/mL; 31,2 e 125 µg/mL; 62,5 e 500 µg/mL, respectivamente. O perfil fungicida foi apresentado para *C. albicans* ATCC 90028, *C. albicans* ATCC MYA 2876, *C. CBS 566*, *C guilliermondii. rugosa* IZ 12, *C. lusitaniae* IZ 06, *C. glabrata* IZ 07, *C. dubliniensis* CBS 7987, *C. albicans* CBS 562, *C. tropicalis* CBS 94 nas concentrações de CIM e CFM : 125 e 250 µg/mL; 125 e 250 µg/mL; 62,5 e 125 µg/mL; 31,2 e 62,5 µg/mL; 250 e 250 µg/mL; 125 e 250 µg/mL; 125 e 125 µg/mL; 125 e 250 µg/mL; 125 e 250 µg/mL, respectivamente.

Tabela 2 - Perfil de susceptibilidade do óleo essencial de *Elionurus muticus*.

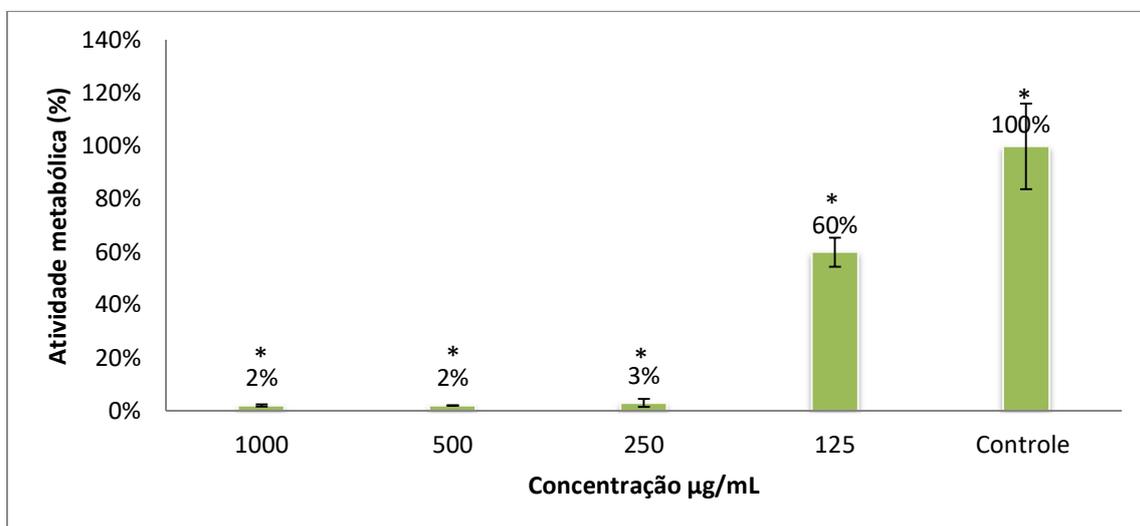
Microrganismos	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM ($\mu\text{g/mL}$)	CFM/CIM	Perfil do óleo	CIM – Fluconazol ($\mu\text{g/mL}$)	CIM – Anfotericina B ($\mu\text{g/mL}$)
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	125	250	2	Fungicida	250	1000
<i>C. albicans</i> CBS 562	125	250	2	Fungicida	1000	500
<i>C. albicans</i> MYA 2876	125	250	2	Fungicida	125	250
<i>C. guilliermondii</i> CBS 566	62,5	125	2	Fungicida	4000	500
<i>C. krusei</i> CBS 573	31,2	125	4	Fungistático	8000	500
<i>C. utilis</i> CBS 5609	31,2	125	4	Fungistático	2000	500
<i>C. rugosa</i> IZ 12	31,2	62,5	2	Fungicida	8000	500
<i>C. lusitaniae</i> IZ 06	250	250	1	Fungicida	125	500
<i>C. glabrata</i> IZ 07	125	250	2	Fungicida	8000	2000
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	125	125	1	Fungicida	250	500
<i>C. parapsilosis</i> CBS 604	62,5	500	8	Fungistático	8000	2000
<i>C. tropicalis</i> CBS 94	125	250	2	Fungicida	500	

5.3 ENSAIOS DO BIOFILME DE *CANDIDA ALBICANS* ATCC MYA 2876

5.3.1 Ensaio XTT

O óleo essencial foi testado com a finalidade de avaliar a atividade metabólica do biofilme de *Candida albicans* ATCC MYA 2876 através da quantificação colorimétrica com XTT. Os resultados deste ensaio foram analisados através da análise estatística ANOVA, variação *Dunnet*, bilateral ($P < 0,01$) do Programa Biostat 5.0 e os mesmos estão expressos no Gráfico 1 e 2.

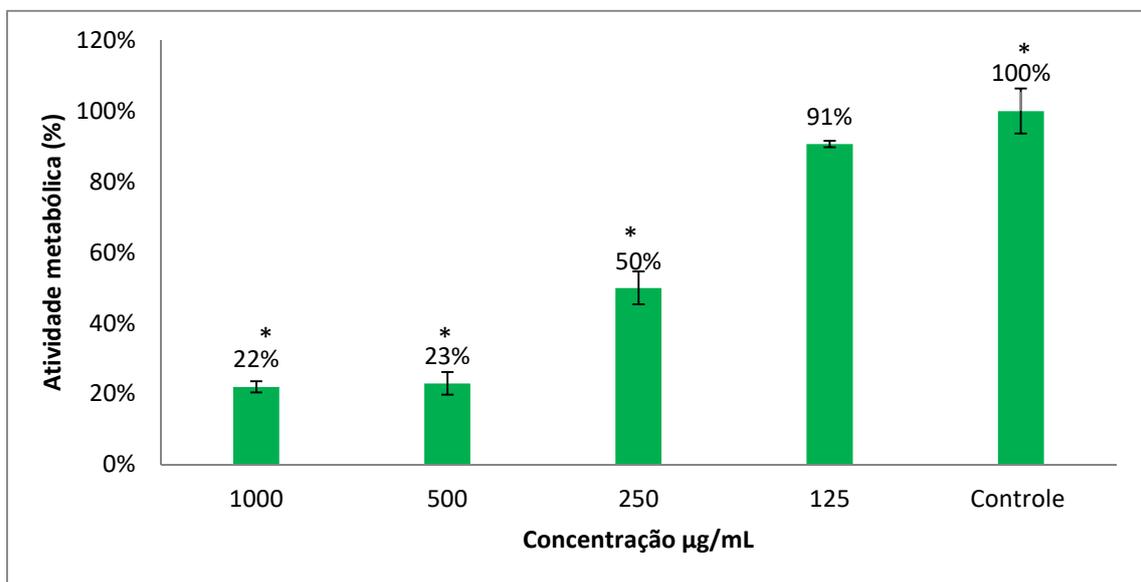
No Gráfico 1, observamos diminuição da atividade metabólica do biofilme em formação dose dependente das concentrações crescentes do óleo essencial. Nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$, o biofilme em formação, apresentou atividade metabólica de 2%, 2% e 3%, respectivamente. Na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a CIM desta cepa, o biofilme em formação apresentou 60% de atividade metabólica. Todas as concentrações testadas demonstraram diferenças estatísticas comparada ao controle.



*Dados estatisticamente significantes segundo Anova um critério seguido de Dunnett com $p < 0,01$

Gráfico 1 - Atividade metabólica do biofilme em formação de *C. albicans* ATCC MYA 2876 exposto ao óleo essencial de *Elionurus muticus*

No Gráfico 2, também observamos, diminuição da atividade metabólica do biofilme maduro dose dependente das concentrações crescentes do óleo essencial. Com o tratamento do óleo essencial nas concentrações de 1000, 500 e 250 $\mu\text{g/mL}$ apresentando atividade metabólica de 22%, 23% e 50%, respectivamente. Na concentração de 125 $\mu\text{g/mL}$, correspondente a CIM desta cepa, o biofilme maduro apresentou 91% de atividade metabólica não demonstrando diferença estatística comparada ao controle.



*Dados estatisticamente significantes segundo Anova um critério seguido de Dunnett com $p < 0,01$

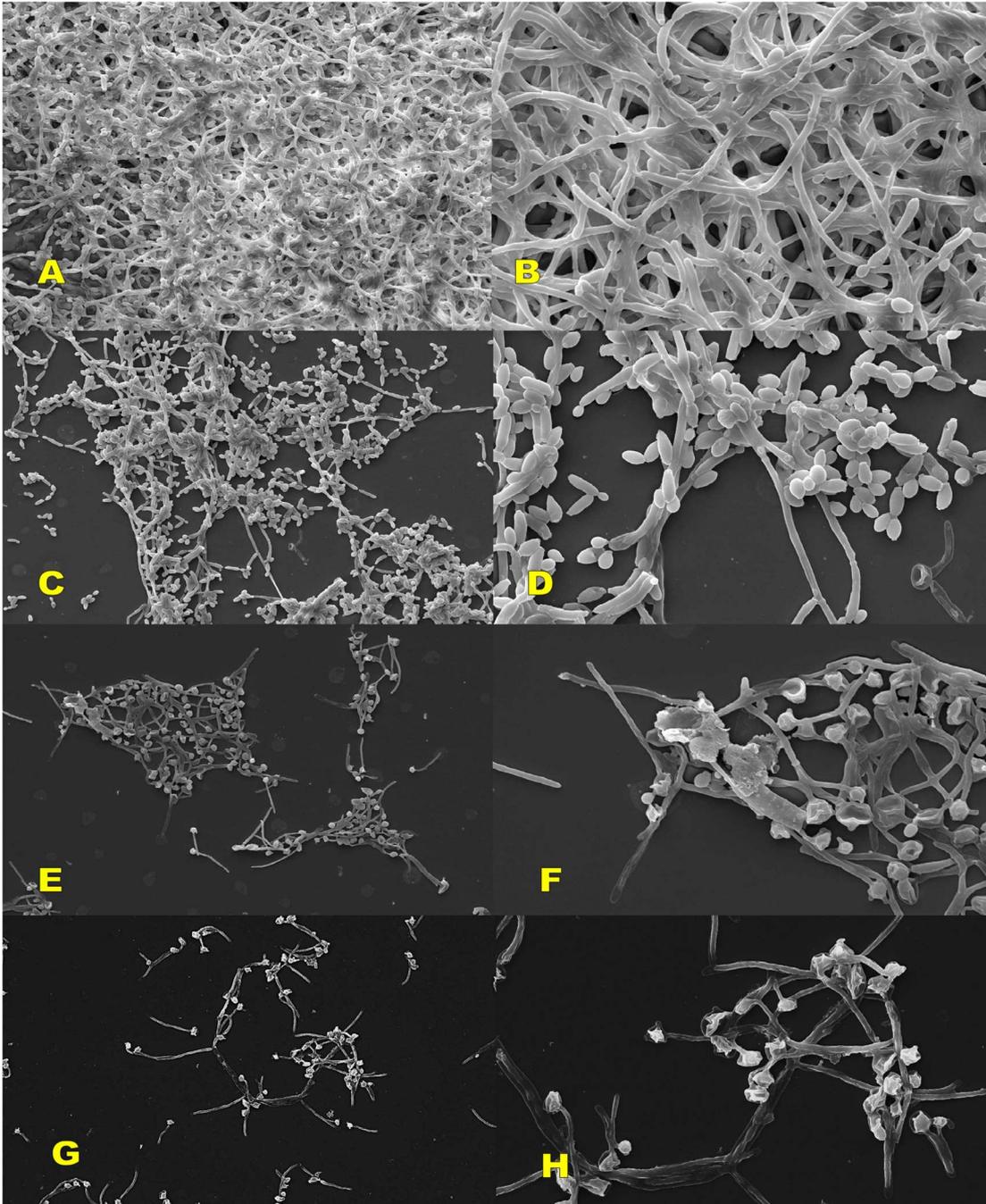
Gráfico 2 - Atividade metabólica do biofilme maduro de *C. albicans* ATCC MYA 2876 exposto ao óleo essencial de *Elionurus muticus*

5.3.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A avaliação do efeito do óleo essencial sobre a morfologia celular do biofilme de *Candida albicans* ATCC MYA 2876 foi feita através da visualização do biofilme no Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV). Para esta análise foi utilizada várias concentrações do óleo essencial.

As alterações morfológicas nas células do biofilme em formação foram observadas após o tratamento com o óleo essencial de *Elionurus muticus* e estão representadas na Figura 1, nos subitens de A a H. O controle do biofilme em formação está representado nos subitens A e B, mostrando as células em forma de hifas ou

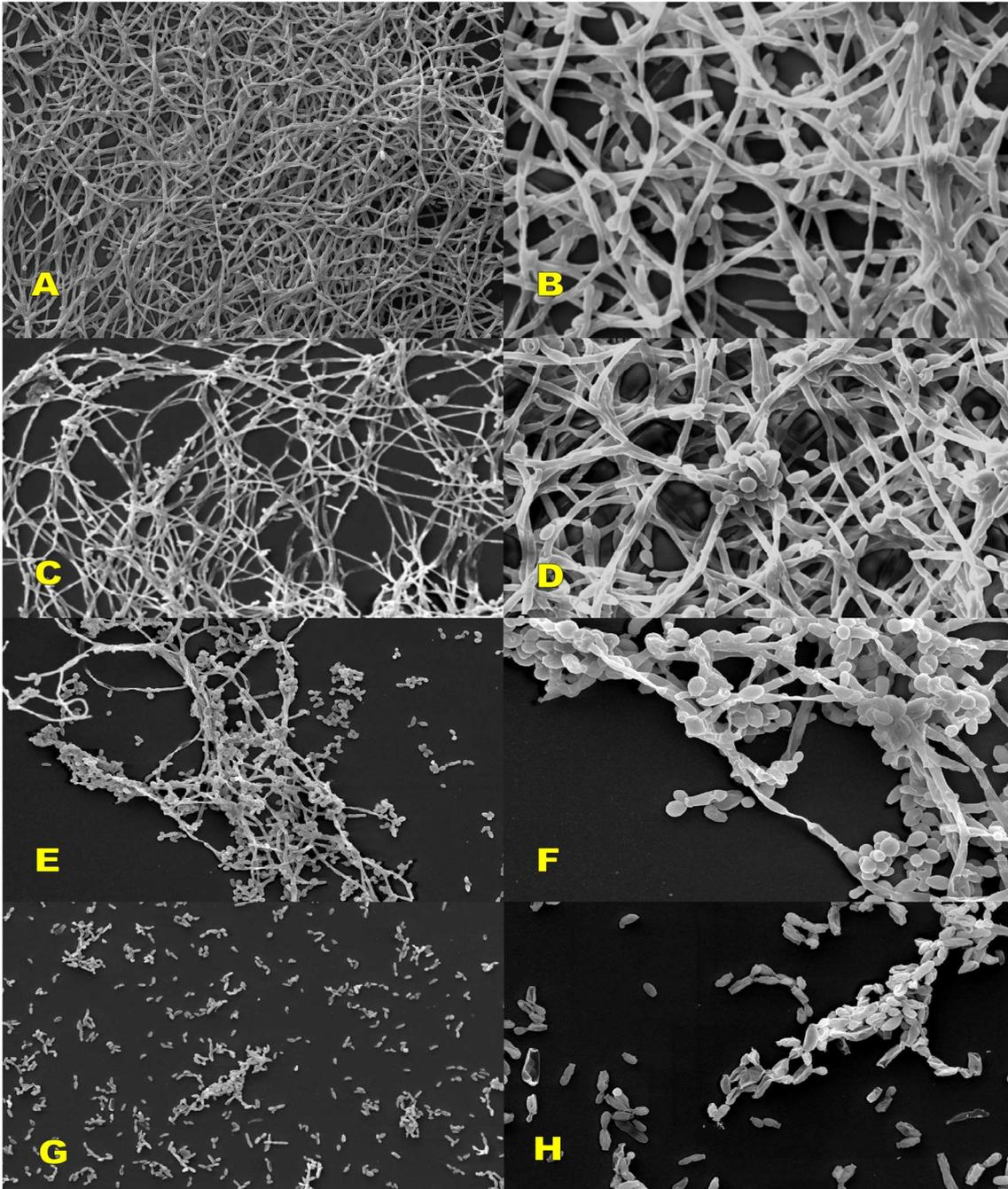
leveduras com superfície celular uniforme. As micrografias eletrônicas de varredura do biofilme em formação tratado demonstraram alterações morfológicas conforme o aumento da concentração do óleo essencial de *Elionurus muticus*. Os subitens C e D representam o biofilme em formação quando tratado com 125 µg/mL, mostrando que as células estão em sua maioria no formato de hifas com superfície lisa, demonstrando aspectos morfológicos semelhantes ao controle. Os subitens de E ao H representam o biofilme em formação tratado com 312,5 µg/mL e 1250 µg/mL, mostrando que as células em forma de hifas ou leveduras apresentaram um baixo volume citozólico e irregularidades na superfície celular.



A) Biofilme em formação sem tratamento, no aumento de 500 x; B) Biofilme em formação , no aumento de 1500 x; C) Biofilme em formação com o tratamento de 125 µg/mL, no aumento de 500x; D) Biofilme em formação com o tratamento de 125 µg/mL, no aumento de 1500x; E) Biofilme em formação com o tratamento de 312,5 µg/mL, com o aumento de 500x; F) Biofilme em formação com o tratamento de 312,5 µg/mL, com o aumento de 1500x; G) Biofilme em formação com o tratamento de 1250 µg/mL, com o aumento de 500x; H) Biofilme em formação com o tratamento de 1250 µg/mL, com o aumento de 1500x. O aumento de 500x corresponde 50 µm e o aumento de 1500x corresponde 10 µm em escala.

Figura 1 - Imagens de M.E.V. do biofilme em formação de *C. albicans* ATCC MYA 2876 tratado e não tratado com o óleo essencial de *Elionurus muticus*.

As alterações morfológicas do biofilme maduro após o tratamento com o óleo essencial de *Elionurus muticus* são mostradas na Figura 2, nos subitens de A ao H. O controle do biofilme maduro está representado nos subitens A e B, mostrando as células em forma de hifas ou leveduras com superfície celular uniforme em quantidades consideráveis. Os subitens C e D representam o biofilme maduro quando tratado com 125 µg/mL, mostrando que as células estão em sua maioria no formato de hifas com superfície lisa, demonstrando aspectos morfológicos semelhantes ao controle, porém houve diminuição na quantidade de hifas. Os subitens E e F representam o biofilme maduro quando tratado com 312,5 µg/mL observando algumas hifas com regiões de diminuição de espessura e baixo volume citozólico, em relação ao controle. Os subitens G e H representam o biofilme maduro quando tratado com 1250 µg/mL, apresentando hifas e leveduras com baixo volume citozólico e superfície celular irregular, com diminuição significativa da quantidade de hifas. Foi observado no biofilme maduro que conforme o aumento da concentração testada houve diminuição gradativa da quantidade de hifas.



A) Biofilme maduro sem tratamento, no aumento de 500 x; B) Biofilme maduro sem tratamento, no aumento de 1500 x; C) Biofilme maduro com o tratamento de 125 µg/mL, no aumento de 500x; D) Biofilme maduro com o tratamento de 125 µg/mL, no aumento de 1500x; E) Biofilme maduro com o tratamento de 312,5 µg/mL, com o aumento de 500x; F) Biofilme maduro com o tratamento de 312,5 µg/mL, com o aumento de 1500x; G) Biofilme maduro com o tratamento de 1250 µg/mL, com o aumento de 500x; H) Biofilme maduro com o tratamento de 1250 µg/mL, com o aumento de 1500x. O aumento de 500x corresponde 50 µm e o aumento de 1500x corresponde 10 µm em escala.

Figura 2 - Imagens de M.E.V. do biofilme maduro de *C. albicans* ATCC MYA 2876 tratado e não tratado com o óleo essencial de *Elionurus muticus*.

5.4 TOXICIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ELIONURUS MUTICUS* EM CÉLULAS HACAT

O ensaio de toxicidade *in vitro* realizado em queratinócitos normais humanos imortalizados não transformados – Hacat (Gráfico 3) incubados em diferentes concentrações do óleo essencial de *Elionurus muticus* (125 à 16000 µg/mL) apresentaram crescimento celular acima de 50%, quando comparadas ao controle em todas as concentrações testadas, indicando baixa citotoxicidade neste ensaio.

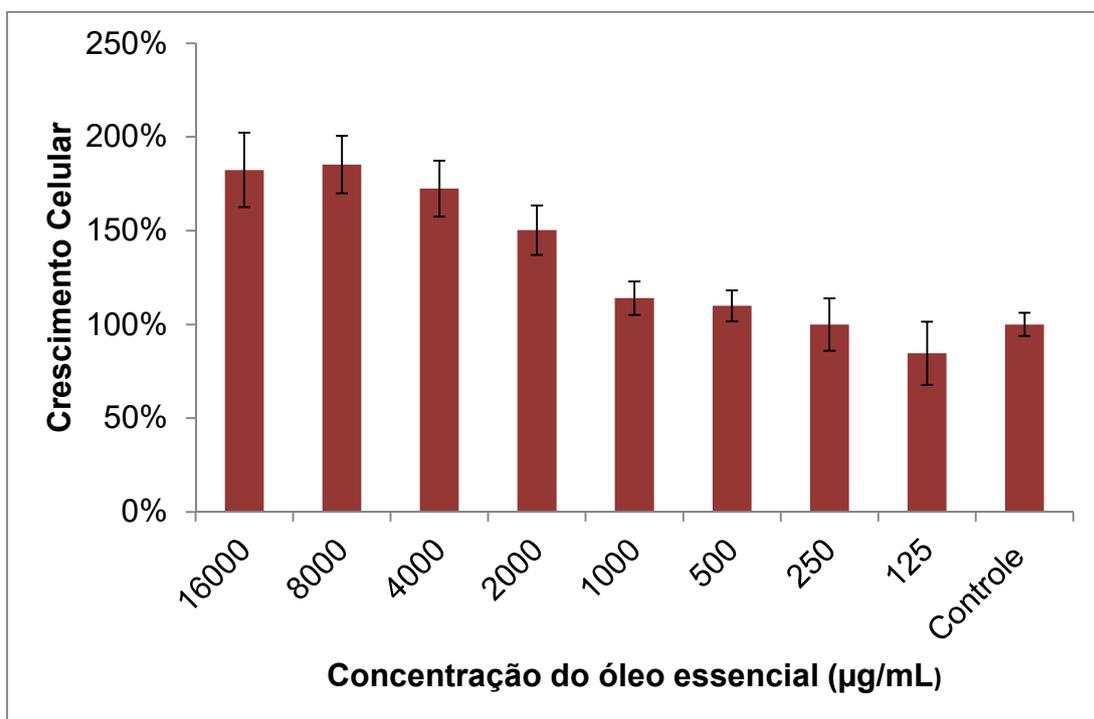


Gráfico 3 - Toxicidade *in vitro* do óleo essencial de *Elionurus muticus* em células Hacat .

5.5 TOXICIDADE *IN VIVO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *ELIONURUS MUTICUS* EM LARVAS DE *GALLERIA MELLONELLA*

A toxicidade *in vivo* foi avaliada através da quantidade de larvas vivas após o tratamento com diferentes concentrações do óleo essencial. Verificou-se após 72 horas de exposição ao óleo essencial que a taxa de sobrevivência das larvas foi de 100% em todas as concentrações testadas (Gráfico 4), indicando nenhuma toxicidade neste ensaio.

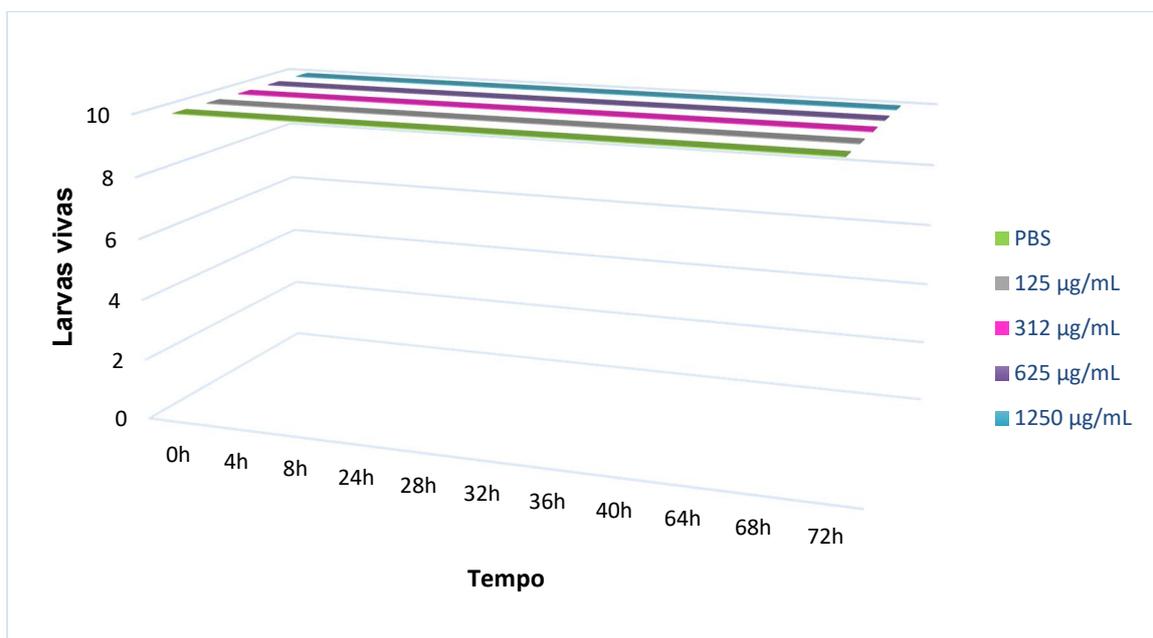


Gráfico 4 - Toxicidade *in vivo* do óleo essencial de *Elionurus muticus* em larvas de *Galleria mellonella*.

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, a pesquisa em plantas medicinais tem sido um recurso viável na descoberta de novos medicamentos para várias aplicações na medicina. O uso de óleos essenciais extraídos de vários gêneros de plantas apresentou várias indicações terapêuticas, dentre elas a ação antisséptica, antifúngica e antimicrobiana (Pinto et al., 2017). *Elionurus muticus* é uma gramínea dos pampas brasileiro que tem despertado o interesse por conter em sua composição propriedades antissépticas (Füller et al., 2014)

A cromatografia gasosa do óleo essencial de *Elionurus muticus* revelou a presença de importantes monoterpenóides, principalmente, do citronelal (87,27%) e outros, como o isopulegol e 1,8-cineol. No geral, o mecanismo antifúngico dos monoterpenóides, envolve a ruptura da membrana citoplasmática, a inativação e inibição da síntese de enzimas intracelulares e extracelulares (Cowan, 1999; Garcia et al, 2008).

O citronelal é um monoterpenóide que possui ação anti-candida demonstrada em vários artigos científicos. Seu mecanismo de ação anti-candida deve-se principalmente sua ação na membrana celular, mitocôndrias e DNA. Na membrana celular, segundo Singh et al. (2016), o citronelal reduziu os níveis de ergosterol. O citronelal também, segundo Saibabu et al. (2017), originou mitocôndrias disfuncionais reduzindo sua atividade metabólica (61,5%) e induzindo à danos no DNA mostrando diferenças significativas na expressão gênica .

Os dados dos testes de CIM do presente estudo, mostraram valores de 31,2 a 125 µg/mL e valores de CFM de 625 a 500 µg/mL. Estes resultados demonstram perfil de atividade fungicida do óleo essencial de *Elionurus muticus* contra a maioria cepas *Candida* spp. testadas (Tabela 2).

Esses dados, em princípio, demonstram ação antifúngica deste óleo corroborando com a literatura. Chagonda & Fungirayi. (2016) também descrevem a atividade antifúngica contra *C. albicans*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans* com valores de CIM variando de 0,5 µg/mL a 5 µg/mL e CFM variando de 2,5 a 10 µg/mL,

usando a técnica de disco difusão, uma metodologia diferente da utilizada nesta pesquisa.

A atividade antimicrobiana, também é apresentada em alguns artigos, usando a técnica de microdiluição no caldo e difusão em disco, obtendo-se valores de CIM que variam de 1000 µg/mL a 150000 µg/mL contra *Escherichia Coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus Coagulase-Negativo*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Streptococcus uberis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus cereus* (Bohm et al., 2012; Lambrecht et al., 2013; Moreno et al., 2013).

Esses dados quando analisados em conjunto, demonstram que o óleo essencial de *Elionurus muticus* exibe ação antibacteriana e antifúngica contra os microrganismos testados de maneira diversa, indicando um potencial antimicrobiano.

Os biofilmes são aglomerados microbianos bem organizados que produzem uma matriz autoproduzida a partir de uma série de compostos que incluem DNA extracelular (eDNA), proteínas e polissacarídeos. Estes compostos são ligados a uma superfície (quando originados em dispositivos médicos ou dentes) ou são suspensos (em muco ou em feridas crônicas) (Flemming & Wingender, 2010). A sua forma confere vantagens aos microrganismos envolvidos nessa matriz quando comparada as células planctônicas, incluindo a tolerância aos antimicrobianos, a evasão da defesa imunitária do hospedeiro e persistência (Davies, 2003; Gomes et al, 2018).

O óleo essencial se mostrou eficiente na diminuição da atividade metabólica do biofilme em formação, exibindo aproximadamente 60% de atividade metabólica do biofilme na concentração de 125 µg/mL. Nas concentrações de 1000 µg/mL, 500 µg/mL e 250 µg/mL houve diminuição significativa da atividade metabólica do biofilme em formação comparado ao controle, exibindo atividade metabólica de 2%, 2% e 3%, respectivamente. Já no biofilme maduro o óleo essencial de *E. muticus* também demonstrou diminuição da atividade metabólica do biofilme maduro até a concentração de 250 µg/mL, na concentração de 125 µg/mL.

Essas observações demonstram um potencial de ação do óleo essencial de *E. muticus* na diminuição da atividade metabólica do biofilme em formação e maduro. Esses resultados, em relação a diminuição da atividade metabólica de ambos

os biofilmes, sugerem o seu uso como uma alternativa antimicrobiana, como agente principal ou como coadjuvantes. Esses dados, no entanto, deverão ser complementados com outros estudos que visem determinar as características de seus componentes bioativos somado as suas propriedades farmacológicas, para que possam, efetivamente torná-lo um fitoterápico, como normalmente se procede.

Vários artigos demonstram diminuição da atividade metabólica com a administração do citrônial ou de óleos essenciais contendo quantidade significativa desse componente ativo em biofilmes de *Candida* (Taweechaisupapong et al, 2012; Raut et al, 2013; De Toledo et al, 2016; Guiotti et al, 2016), confirmando as propriedades antimicrobianas dessa espécie. Mais dados sobre os óleos essenciais provenientes da extração das várias partes das plantas, deverão também ser investigadas com o propósito de comparar suas propriedades em relação aos seus componentes bioativos, capacidade de inibir microrganismos e alterações morfológicas em suas células.

Com a finalidade de investigar possíveis alterações morfológicas do biofilme após o tratamento com o óleo essencial, as amostras de biofilme foram analisadas visualmente por MEV, nas concentrações de 1250, 312,5 e 125 µg/mL. Nas maiores concentrações do óleo essencial testadas foram observadas alterações morfológicas, como diminuição na espessura das hifas, baixo volume citozólico nas leveduras e hifas e irregularidades na superfície celular.

Diversos estudos apresentam alterações morfológicas significativas no biofilme de *Candida* após tratamento com citrônial ou com óleos contendo quantidade significativa desse componente (Khan e Ahmad, 2012; De Toledo et al, 2016; Guiotti et al, 2016), confirmando essa propriedade de ação estrutural.

Uma vez que o principal constituinte do óleo essencial de *Elionurus muticus* é o monoterpenóide citrônial (87,27%), isso é indicativo que o óleo essencial de *E. muticus* possui atividade antibiofilme, promovendo alterações morfológicas no biofilme de *C.albicans* como demonstrado neste estudo. Outras substâncias presentes nesses óleos deverão ser investigadas, a fim de ampliar os conhecimentos básicos sobre essa planta.

Os ensaios de toxicidade de compostos em estudo estão sendo direcionados de forma constante em abordagem *in vitro* baseada em células humanas e abordagem *in vivo* por animais não convencionais devido razões que incluem relevância científica, eficiência, custo e legitimidade ética (Zhang et al, 2018).

Neste estudo, a toxicidade *in vitro* e *in vivo* foram testadas com as células Hecat e larvas de *Galleria mellonella*, respectivamente. No ensaio de toxicidade *in vitro* com células Hecat, o crescimento celular foi acima de 50% em todas as concentrações testadas quando comparadas ao controle, indicando baixa citotoxicidade. No ensaio *in vivo*, após 72 horas da exposição ao óleo essencial, todas as larvas de *Galleria mellonella* permaneceram vivas em todas as concentrações testadas demonstrando baixa toxicidade, relevância e eficiência como substância bioativa.

Algumas publicações exibem baixa toxicidade do citronelal e óleos essenciais com quantidade significativa desse componente, em diversos estudos, envolvendo testes *in vitro* com células humanas e testes *in vivo* (Koba et al, 2009; Campelo et al, 2013; Saibabu et al, 2017). Esses dados indicam baixa toxicidade, sugerindo pouco ou nenhum efeito tóxico desse componente, revelando possíveis aplicações terapêuticas.

De modo geral, os resultados apresentados nesta pesquisa corroboram com outros estudos nessa linha de investigação, demonstrando os efeitos antimicrobianos do óleo essencial de *Elionurus muticus*, e seu potencial antimicrobiano.

7 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Elionurus muticus* :

- Apresenta Citronelal como componente ativo principal;
- Demonstra ação antifúngica de maneira dose dependente contra as cepas padrão de *Candida*;
- Revela ação antifúngica contra o biofilme em formação e maduro de *C.albicans*, observando-se diminuição da atividade metabólica dessas estruturas.
- Altera morfológicamente as células do biofilme de *C.albicans* apresentando irregularidades na superfície celular, baixo volume citozólico e diminuição da quantidade de hifas.
- Não apresenta toxicidade significativa em células humanas Hacat e em larvas de *Galleria mellonella*.

REFERÊNCIAS*

- Bohm B, Gonçalves C, Schuch L, Chaffe A, Schubert R, Schiedeck G, et al. Sensibilidade de bactérias relacionadas com otite a *Elionurus latiflorus* e *Cymbopogon citratus*. In: Embrapa Clima Temperado-Resumo em anais de congresso (ALICE). In: Anais do 22º Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Bento Gonçalves: UFRGS; 2012.
- Braunsdorf C, LeibundGut-Landmann S. Modulation of the Fungal-Host Interaction by the Intra-Species Diversity of *C. albicans*. *Pathogens*. 2018 Jan 17;7(1). p: E11.
- Campelo LM, Sá CG, Feitosa CM, Sousa GF, Freitas RM. Constituintes químicos e estudos toxicológicos do óleo essencial extraído das folhas de *Citrus limon Burn* (Rutaceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2013 Jan 1;15 (1): 708-16.
- Campos SC, Silva CG, Campana PRV, Almeida VL. Revisão: Toxicidade de espécies vegetais. *Rev. Bras. Pl. Med.* 2016 Jan 18 (1).
- Cauchie M, Desmet S, Lagrou K. *Candida* and its dual lifestyle as a commensal and a pathogen. *Res Microbiol*. 2017 Nov - Dec;168 (9-10): 802-810.
- Cavalheiro M, Teixeira MC. *Candida* Biofilms: Threats, Challenges, and Promising Strategies. *Front Med (Lausanne)*. 2018 Feb 13; 5:28.
- Chagonda LS, Fungirayi B. Antifungal Activity of the Essential Oil of *Elionurus Muticus* (Spreng) Kunth from Zimbabwe against *Candida albicans*, *C. krusei* and *Cryptococcus neoformans*. *J Multi Eng Scie Tech*. 2016 Jul; 3 (7): 5331-5335.
- CLSI. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Norma M27-A. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras. 3. ed. Pennsylvania: NCCLS; 2008.
- Colombo I, Sangiovanni E, Maggio R, Mattozzi C, Zava S, Corbett Y, et al. HaCaT Cells as a Reliable In Vitro Differentiation Model to Dissect the Inflammatory/Repair Response of Human Keratinocytes. *Mediators Inflamm*. 2017;2017:7435621. doi: 10.1155/2017/7435621.
- Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*. 1999;12 (4): 564-582.

* De acordo com as normas da UNICAMP/FOP, baseadas na padronização do International Committee of Medical Journal Editors - Vancouver Group. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o PubMed

Davies D. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 114–122.

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.

Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BD, Potent Antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol.* 2010; 161: 534-40.

Flemming H.-C., Wingender J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* 2010; 8: 623–633.

Füller TN, Bertrand C, Simon A, Inchausti de Barros IB, Barbosa Neto JF. *Elionurus muticus* as an alternative source of citral from Pampa biome, Brazil. *J Oleo Sci.* 2014; 63 (11): 1109-16.

Füller TN. Caracterização fenotípica, fitoquímica e molecular de populações de *Elionurus* sp. Humb. & Bompl ex Willd (capim-limão) [dissertação]. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul; 2010.

Füller TN. Caracterização genética e química e atividade biológica do óleo essencial de populações naturais de *Elionurus* sp. Humb. & Bompl ex Willd (capim-limão) [tese]. Porto Alegre: Faculdade de Agronomia, Universidade do Rio Grande do Sul; 2013.

Garcia R, Alves ES, Santos MP, Aquije GM, Fernandes AA, Dos Santos RB, et al. Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Braz J Microbiol.* 2008 Jan; 39 (1): 163-8.

Gomes Von Borowski R, Gnoatto SCB, Macedo AJ, Gillet R. Promising Antibiofilm Activity of Peptidomimetics. *Front Microbiol.* 2018 Sep; 13; 9: 2157.

Guiotti AM, Cunha BG, Paulini MB, Goiato MC, dos Santos DM, Duque C, et al. Antimicrobial activity of conventional and plant-extract disinfectant solutions on microbial biofilms on a maxillofacial polymer surface. *The Jour Pros Dent.* 2016 Jul 1;116 (1): 136-43.

Gullo FP, Sardi JC, Santos VA, Sangalli-Leite F, Pitangui NS, Rossi SA, et al. Antifungal activity of maytenin and pristimerin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012; 2012: 340787.

Kelly J, Kavanagh K. Caspofungin primes the immune response of the larvae of *Galleria mellonella* and induces a non-specific antimicrobial response. *Jour Med Micro*. 2011 Feb 1; 60 (2):189-96.

Khan MS, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*. 2012.

Koba K, Sanda K, Guyon C, Raynaud C, Chaumont JP, Nicod L. In vitro cytotoxic activity of *Cymbopogon citratus* L. and *Cymbopogon nardus* L. essential oils from Togo. *Bangladesh J Pharmacol*. 2009 Jan 1;4: 29-34.

Lambrecht Gonçalves C, Schiavon A, Bender D, Voigt Mota F, Faccin A, NoreMBERG Schubert R, et al. Actividad antibacteriana de los extractos de *Cymbopogon citratus*, *Elionurus* sp. y *Tagetes minuta* contra bacterias que causan mastitis. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 2013 Sep;18 (3): 487-94.

Lim CS, Rosli R, Seow HF, Chong PP. *Candida* and invasive candidiasis: back to basics. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2012 Jan;31 (1): 21-31.

Lima RK, Cardoso MD, Moraes JC, Carvalho SM, Melo BA, Vieira SS Chemical composition and toxicity of essential oils to the green-aphid *Schizaphis graminum* (Rondani, 1852). *Arq Instit Biol*. 2014;81(1):22-9.

Moreno PR, da Costa-Issa FI, Rajca-Ferreira AK, Pereira MA, Kaneko TM. Native Brazilian plants against nosocomial infections: a critical review on their potential and the antimicrobial methodology. *Curr Top Med Chem*. 2013;13(24):3040-78.

Neppelenbroek KH, Seó RS, Urban VM, Silva S, Dovigo LN, Jorge JH, Campanha NH. Identification of *Candida* species in the clinical laboratory: a review of conventional, commercial, and molecular techniques. *Oral Dis*. 2014 May; 20 (4): 329-44.

Pappas PG, Lionakis MS, Arendrup MC, Ostrosky-Zeichner L, Kullberg BJ. Invasive candidiasis. *Nat Rev Dis Primers*. 2018 May 11; 4:18026.

Pierce CG, Uppuluri P, Tristan AR, Wormley FL Jr, Mowat E, Ramage G, et al. A simple and reproducible 96-well plate-based method for the formation of fungal biofilms and its application to antifungal susceptibility testing. *Nat Protoc.* 2008;3 (9): 1494-500.

Pinto E, Gonçalves MJ, Cavaleiro C, Salgueiro L. Antifungal Activity of *Thapsia villosa* Essential Oil against *Candida*, *Cryptococcus*, *Malassezia*, *Aspergillus* and Dermatophyte Species. *Molecules.* 2017 Sep 22; 22 (10).

Portela MB, Lima de Amorim E, Santos AM, Alexandre da Rocha Curvelo J, de Oliveira Martins K, Capillé CL, et al. *Candida* species from oral cavity of HIV-infected children exhibit reduced virulence factors in the HAART era. *Microb Pathog.* 2017 Jan;102: 74-81.

Raut JS, Shinde RB, Chauhan NM, Karuppayil SM. Terpenoids of plant origin inhibit morphogenesis, adhesion, and biofilm formation by *Candida albicans*. *Biofouling.* 2013;29 (1): 87-96.

Romo JA, Pierce CG, Chaturvedi AK, Lazzell AL, McHardy SF, Saville SP, et al. Development of Anti-Virulence Approaches for Candidiasis via a Novel Series of Small-Molecule Inhibitors of *Candida albicans* Filamentation. *MBio.* 2017 Dec 5;8 (6).

Rossoni RD, Barros PP, Freire F, Santos JDD, Jorge AOC, Junqueira JC. Study of Microbial Interaction Formed by "*Candida krusei*" and "*Candida glabrata*": "*In Vitro*" and "*In Vivo*" Studies. *Braz Dent J.* 2017 Nov-Dec; 28 (6): 669-674.

Sabini LI, Gabrielli PC, Torres CV, Escobar FM, Cacciabue M, Rovera M, et al. Study of the cytotoxic and antifungal activity of the essential oil of *Elyonurus muticus* against *Candida* spp. *Strain.* 2006; 1 (2): 3-4.

Saibabu V, Singh S, Ansari MA, Fatima Z, Hameed S. Insights into the intracellular mechanisms of citronellal in *Candida albicans*: implications for reactive oxygen species-mediated necrosis, mitochondrial dysfunction, and DNA damage. *Revista da Soc Bras de Medic Trop.* 2017 Aug; 50 (4): 524-9.

Sardi JC, Freires IA, Lazarini JG, Infante J, de Alencar SM, Rosalen PL. Unexplored endemic fruit species from Brazil: Antibiofilm properties, insights into mode of action, and systemic toxicity of four *Eugenia* spp. *Microb Pathog.* 2017 Apr; 105: 280-287.

Scordino F, Giuffrè L, Barberi G, Marino Merlo F, Orlando MG, Giosa D, et al. Multilocus Sequence Typing Reveals a New Cluster of Closely Related *Candida tropicalis* Genotypes in Italian Patients With Neurological Disorders. *Front Microbiol.* 2018 Apr 6; 9: 679.

Scorzoni L, de Lucas MP, Mesa-Arango AC, Fusco-Almeida AM, Lozano E, Cuenca-Estrella M, et al. Antifungal efficacy during *Candida krusei* infection in non-conventional models correlates with the yeast in vitro susceptibility profile. *PLoS One.* 2013;8 (3): e60047.

Silva WJ, Seneviratne J, Samaranayake LP, Del Bel Cury AA. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly(methyl methacrylate)resin surface. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2010 Jul; 94 (1):149-56.

Singh S, Fatima Z, Hameed S. Citronellal-induced disruption of membrane homeostasis in *Candida albicans* and attenuation of its virulence attributes. *Ver Soc Bras Med Trop.* 2016.

Taweechaisupapong S, Aieamsaard J, Chitropas P, Khunkitti W. Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. *Sout Afric Jour of Bota.* 2012 Jul 1; 81: 95-102.

Vichai V, Kirtikara K. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat Protoc.* 2006;1 (3):1112-6.

Zhang Q, Li J, Middleton A, Bhattacharya S, Conolly RB. Bridging the Data Gap From *in vitro* Toxicity Testing to Chemical Safety Assessment Through Computational Modeling. *Front in Publ Heal.* 2018. 6, 261.

ANEXOS

ANEXO 1 - Apresentação dos picos cromatográficos (CG/EM) do óleo essencial de *Elionurus muticus*.

Gráfico 5 - Apresentação dos picos cromatográficos (CG/EM) do óleo essencial de *Elionurus muticus*.

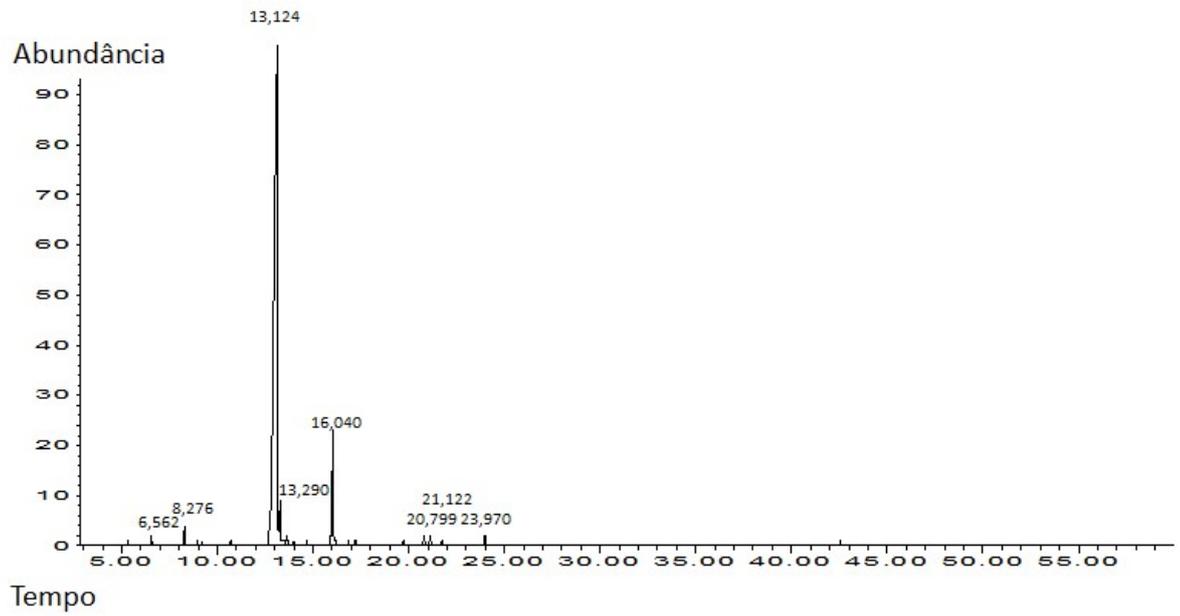


Gráfico 5 -

ANEXO 2 - Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de *Elionurus muticus* através de Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massas (CG/EM).

Tabela 3 - Compostos, Índices de Retenção e suas porcentagens identificados no óleo essencial de *Elionurus muticus* através de Cromatografia Gasosa Espectrometria de Massas (CG/EM).

TR	COMPOSTO	IR	%
6,562	SEM IDENTIFICAÇÃO		0,23%
8,276	CINEOLE <1,8>	1033	0,64%
13,124	CITRONELLAL	1153	87,27%
13,290	ISOPULEGOL	1156	2,91%
16,040	CITRONELLOL	1228	7,73%
20,799	DIHYDROCITRONELLOL ACETATE	1320	0,44%
21,122	CITRONELLYL ACETATE	1354	0,40%
23,970	CARYOPHYLLENE <(Z-)>	1404	0,39%