



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA**

JULLIANA CARIRY PALHANO FREIRE

**AVALIAÇÃO DE HIDROGEL INCORPORADO AO CITRAL APLICADO AO
TRATAMENTO DE CANDIDOSE BUCAL**

CAMPINA GRANDE

2021

JULLIANA CARIRY PALHANO FREIRE

**AVALIAÇÃO DE HIDROGEL INCORPORADO AO CITRAL APLICADO AO
TRATAMENTO DE CANDIDOSE BUCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e otimização de produtos relacionados ao tratamento de agravos à saúde bucal.

Orientador: Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques

CAMPINA GRANDE

2021

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

F866a Freire, Julliana Cariry Palhano.
Avaliação de hidrogel incorporado ao citral aplicado ao tratamento de candidose bucal [manuscrito] / Julliana Cariry Palhano Freire. - 2021.
126 p. : il. colorido.

Digitado.
Tese (Doutorado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2021.
"Orientação : Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques, Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."
1. Atividade antifúngica. 2. Monoterpeno. 3. Candida. 4. Sistemas de liberação de medicamentos. I. Título
21. ed. CDD 616.969

JULLIANA CARIRY PALHANO FREIRE

**AVALIAÇÃO DE HIDROGEL INCORPORADO AO CITRAL APLICADO AO TRATAMENTO
DE CANDIDOSE BUCAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Área de concentração: Clínica Odontológica

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e otimização de produtos relacionados ao tratamento de agravos à saúde bucal.

Aprovada em: 13/12/2021.

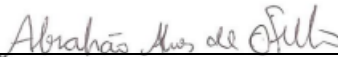
BANCA EXAMINADORA



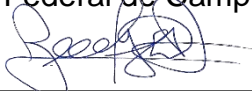
Profa. Dra. Jozinete Vieira Pereira Marques (Orientador)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Profa. Dra. Maria Regina Macêdo-Costa (Titular Externo)
Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho (Titular Externo)
Universidade Federal de Campina Grande (UFCG)



Profa. Dr. Bolívar Ponciano Goulart de Lima Damasceno (Titular Interno)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves (Titular Interno)
Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

AGRADECIMENTOS

À Santíssima Trindade que em véspera de vestibular me mostrou a palavra acima citada e com o olhar de Pai segue me mostrando o caminho que devo seguir. Com o coração transbordando de felicidade chego ao final desta etapa na certeza de que “Tudo concorre para o bem daqueles que amam à Deus”!

À Nossa Senhora, Mestra e Rainha que me guia e protege, intercede e passa sempre a frente em minha vida, preparando meu caminho com o amor materno. Ela está sempre comigo e me guiou até a finalização deste longo percurso que foi o doutorado. À Ela devoto e proclamo “Ave Maria, cheia de graça, bendita és Tu entre as mulheres”!

Aos meus pais Juzênio e Potyra que me deram a vida e cuidam, voltando suas preocupações e projeções, buscando minha felicidade... Eles que possibilitaram toda minha vida acadêmica, agradeço por todo amor e cuidado, na esperança de que essa conquista ainda se multiplique em minha vida. À toda minha família, em especial ao meu avô Juracy Palhano, o qual desde minha infância se preocupou e incentivou meus estudos com seu grande exemplo de homem sábio e que com toda sua trajetória percorrida reconhecida, ajudou e ainda ajuda a muitas pessoas, e uma delas sou eu, sua neta que tanto lhe admira e agradece por se fazer presente em minha vida!

Ao amor que Deus me concedeu, meu marido Eduardo que por graça d’Ele divide a mesma profissão na Odontologia e na docência, que com sua paciência e atenção, me orientou desde o mestrado e que se orgulha por cada realização que tenho e por todo meu crescimento profissional. A ele dedico meu amor e que juntos possamos fazer com que nossa pequena trilhe sua vida com a orientação que Deus tem para ela, dada através da graça da paternidade e maternidade.

Minha filha Ana Júlia que chegou ao mundo no início de uma época difícil para o mundo, a quem me dedico integralmente e a quem todos os meus planos e sonhos agora são para ela e por ela! Como disse o Papa Francisco: “Os filhos da pandemia são especiais”... Rogo para que esteja sempre sobre a poderosa proteção da Mãe Rainha!

A minha querida orientadora Profa. Jozinete Vieira, a qual faz juz desse título não só por nos ensinar, nos passando todo seu conhecimento, buscando sempre abrir o caminho da pesquisa para nós, mas principalmente por seu cuidado com seus alunos, em procurar sempre nosso bem. Demonstrando que o doutorado não é apenas fazer pesquisa, mas principalmente formar um profissional que trilhou anos de estudo, e que agora segue para a luta de aplicar toda essa formação na vida. Agradeço imensamente por ter lhe conhecido e por ter partilhado esses anos com a senhora!

Não posso esquecer de meus grandes orientadores que contribuíram na minha vida acadêmica, Prof Hugo Lemes (orientador de tcc da graduação, PIBIC, e extensão) e Profa Edeltrudes Lima (orientadora de dissertação de mestrado). Dois grandes mestres aos quais tenho profundo orgulho de ter sido orientada e que até hoje rendo frutos graças aos seus ensinamentos. Assim, agradeço à minha casa, a UFPB, a qual me formou na graduação e mestrado e que tenho grande respeito e admiração, pela instituição e pelos professores que a compõem.

À UEPB, que me acolheu não só no doutorado, mas também na docência. Pude ensinar em minha área de atuação nessa instituição e assim, aprender ainda mais, me capacitar ainda mais ensinando! Sou grata a todos os professores da instituição que abrilhantam o curso de Odontologia, aos professores internos e externos que aceitaram participar da banca, a todos os funcionários que possibilitam toda a formação acadêmica com os cuidados na instituição, e a todos os colegas de turma, do grupo de pesquisa e alunos que conheci e dividi a rotina durante esses anos de estudo e ensino.

Enfim, a todos que fizeram ou fazem parte da minha vida, minha gratidão. Hoje concluo uma grande etapa profissional cujo conhecimento construído me acompanhará por toda estrada que trilharei.

“Vou te ensinar, dizeis, vou te mostrar o caminho que deves seguir;

Vou te instruir, fitando em ti os meus olhos”.

Salmos 32:8

RESUMO

A candidose bucal é uma doença frequente em pacientes imunossuprimidos e usuários de próteses dentárias removíveis, ocasionada por fungos que tem demonstrado resistência aos fármacos disponíveis no mercado e alta taxa de recidivas. Nesse contexto, destaca-se a busca de novas alternativas terapêuticas, como por exemplo, o uso de terpenos como o citral que apresenta propriedades de interesse farmacológico. Esse estudo avaliou *in silico* e *in vitro*, a atividade antifúngica do citral isolado sobre *Candida* spp, e incorporado a um hidrogel, bem como analisou as propriedades físico-químicas, ação antifúngica e toxicológica deste hidrogel. Foram utilizadas as cepas: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90031, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750 e cepas clínicas de *C. albicans* A4, *C. albicans* A5 e *C. albicans* A6. Por meio do ensaio *in silico*, foi avaliado o potencial biológico do monoterpeno, sua biodisponibilidade oral teórica e toxicidade oral aguda. Determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e seu efeito sobre a cinética de crescimento de *C. albicans*. Assim como seu mecanismo de ação sobre a biossíntese da parede e membrana celular fúngica. As propriedades físico-químicas do do hidrogel incorporado ao citral (HC) foram determinadas por meio do ph, da resistência à centrifugação, viscosidade e espalhabilidade. Verificou-se a suscetibilidade microbiana HC pelo teste de disco-difusão em ágar. A toxicidade oral aguda e o potencial clastogênico e aneugênico foram avaliados em camudongos *Mus musculus* (2000mg/kg). Os dados foram analisados por estatística descritiva e inferencial. Os ensaios *in silico* demonstraram que o citral apresenta um amplo espectro de ação sobre microrganismos de grande importância clínica. A CIM do citral variou de 62,5 µg/mL a 250 µg/mL e se classificou como agente fungicida. O citral apresentou potencial efeito significativo sobre a cinética de crescimento de *C. albicans* ($p < 0,05$). O provável mecanismo de ação interferiu na membrana plasmática através da interação com o ergosterol. O HC apresentou pH de caráter ácido, boa estabilidade e espalhabilidade, assim como boa viscosidade. O HC apresentou halos de inibição maior ou igual a 10 mm de diâmetro dependendo da concentração analisada, para todas as cepas de *Candida* testadas. O produto inibiu significativamente o crescimento de *C. albicans* em todas as diferentes concentrações avaliadas, entre 15 e 120 minutos, quando comparado ao controle de crescimento. O HC não induziu sinais de toxicidade aguda nos camudongos submetidos ao tratamento por gavagem na dose

única de 2000 mg/kg e produziu um menor número de micronúcleos estatisticamente significativo comparado ao controle positivo (ciclofosfomida a 50 mg/kg) em eritrócitos de camudongos. O citral demonstrou ser um potencial agente antifúngico contra espécies de *Candida*, tanto como composto isolado como incorporado ao hidrogel. O HC apresentou baixa toxicidade e mutagenicidade, sendo promissor para o tratamento de candidose bucal.

Palavras-chave: Atividade antifúngica. *Candida*. Monoterpeno. Sistemas de liberação de fármacos.

ABSTRACT

Oral candidiasis is a frequent disease in immunosuppressed patients and users of removable dentures, caused by fungi that have shown resistance to drugs available on the market and a high rate of recurrence. In this context, the search for new therapeutic alternatives is highlighted, such as the use of terpenes such as citral, which has properties of pharmacological interest. This study evaluated *in silico* and *in vitro* the antifungal activity of citral isolated on *Candida* spp and incorporated into a hydrogel, as well as analyzed the physicochemical, antifungal and toxicological properties of this hydrogel. Strains were used: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90031, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750 and clinical strains of *C. albicans* A4, *C. albicans* A5 and *C. albicans* A6. Through the *in silico* assay, the biological potential of the monoterpene, its theoretical oral bioavailability and acute oral toxicity were evaluated. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and its effect on the growth kinetics of *C. albicans* were determined. As well as its mechanism of action on the biosynthesis of the fungal cell wall and membrane. The physicochemical properties of the hydrogel incorporated into citral (HC) were determined by means of pH, resistance to centrifugation, viscosity and spreadability. The HC microbial susceptibility was verified by the agar disk-diffusion test. Acute oral toxicity and clastogenic and aneugenic potential were evaluated in *Mus musculus* mice (2000mg/kg). Data were analyzed using descriptive and inferential statistics. *In silico* assays demonstrated that citral has a broad spectrum of action on microorganisms of great clinical importance. Citral MIC ranged from 62.5 µg/mL to 250 µg/mL and was classified as a fungicidal agent. Citral had a potentially significant effect on the growth kinetics of *C. albicans* ($p < 0.05$). The likely mechanism of action interfered with the plasma membrane through interaction with ergosterol. The HC had an acidic pH, good stability and spreadability, as well as good viscosity. HC showed inhibition halos greater than or equal to 10 mm in diameter depending on the concentration analyzed, for all *Candida* strains tested. The product significantly inhibited the growth of *C. albicans* at all different concentrations evaluated, between 15 and 120 minutes, when compared to the growth control. HC did not induce signs of acute toxicity in mice submitted to gavage treatment at a single dose of 2000 mg/kg and produced a statistically significant smaller number of micronuclei compared to the positive control (50 mg/kg cyclophosphomide) in mouse erythrocytes. Citral has been shown to be a

potential antifungal agent against *Candida* species, both as an isolated compound and incorporated into the hydrogel. HC showed low toxicity and mutagenicity, being promising for the treatment of oral candidosis.

Keywords: Antifungal activity. *Candida*. Monoterpene. Drug delivery systems.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Fórmula estrutural do citral.....	22
Figura 2: Ilustração esquemática de rede polimérica de hidrogel com substância ativa em seu interior.....	24
Figura 3: Ilustração esquemática do teste de suscetibilidade microbiana por disco-difusão em ágar, utilizando a técnica de inundação da superfície do meio de cultura.....	39
Figura 4: Ilustração esquemática da cinética de crescimento do microrganismo sob ação do produto testado.	40
Figura 5: Ensaio de toxicidade oral aguda em camundongos <i>Mus Musculus</i>	42
Figura 6: Teste de micronúcleo em camundongos <i>Mus Musculus</i> . Introdução do produto teste, anestesia por via intraperitoneal, coleta de material biológico por via intracardíaca seguida de eutanásia, respectivamente.....	43
Figura 7: Ilustração esquemática do processamento histológico das lâminas de sangue periférico de camundongos <i>Mus Musculus</i> e observação de micronúcleos em microscópio óptico de luz (aumento 100x).....	44
Quadro 1: Composição da base do hidrogel formulado.....	34
 Atividade antimicrobiana e efeitos do citral em espécies causadoras de doenças bucais: revisão de literatura	
Figura 1: Fluxograma da revisão de literatura, incluindo as etapas de busca e seleção dos artigos e os resultados observados.....	50
Figura 2: Fórmula estrutural do citral.....	53
 Atividade antifúngica do citral em espécies de <i>Candida</i>: estudo <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	
Figura 1: Efeito do Citral e da Nistatina na cinética de crescimento de <i>C. albicans</i> ATCC 10231 e <i>C.albicans</i> A6 exposta às concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM. Resultados expressos através da média do número de microrganismos (eixo vertical-UFC/mL) segundo os diferentes tempos de ação (eixo horizontal) sob exposição ao citral e à nistatina.....	73
Figura 2: Efeito das substâncias sobre a cinética de crescimento de <i>C.albicans</i>	74

Figura 3: Efeito das substâncias sobre a cinética de crescimento de <i>C.albicans</i> A6 (valores expressos em Log UFC/mL).....	74
Avaliação de hidrogel incorporado ao citral para tratamento de candidose bucal	
Figura 1: Amostras submetidas ao teste de resistência por centrifugação das formulações contendo o fármaco, e sem fármaco, antes da centrifugação (a) e após a centrifugação (b).....	96
Figura 2: Curvas de fluxo representando o comportamento do gel com citral e gel sem citral.	97
Figura 3: Espalhabilidade dos géis (25°C) preparadas a partir da adição do citral e do grupo controle, gel sem citral.....	98
Figura 4: Halos de inibição do teste de susceptibilidade em disco-difusão em ágar para as diferentes cepas de <i>Candida</i>	102
Figura 5: A) Cinética de crescimento microbiano de <i>C.albicans</i> ATCC 10231 numa concentração de inóculo de 5×10^3 UFC/mL submetida ao hidrogel a base de citral e nistatina, assim como o controle de crescimento, nos tempos 15, 30 e 120 minutos. B) Média do crescimento microbiano de <i>C.albicans</i> ATCC 10231 em logarítmo submetido aos tratamentos em diferentes concentrações para cada inóculo testado.....	104
Figura 6: Efeito do hidrogel incorporado com citral (HC 2000mg/kg) sobre a massa corpórea de camundongos <i>Mus musculus</i> fêmeas (A); consumo de ração (B) e consumo de água (C).....	106
Figura 7: A a E) Fotomicrografias de áreas dos rins, fígado, baço, estômago e coração, respectivamente, de camundongos do grupo controle. F a J) Fotomicrografias de áreas dos rins, fígado, baço, estômago e coração, respectivamente, de camundongos do grupo experimental, sem evidências de alterações morfológicas.....	107
Figura 8: Micrografia de eritrócitos capturados com objetiva de 1000x após a administração das substâncias: A) Ciclofosfamida (50 mg / kg); B) veículo; C) HC (2000 mg/kg).....	108

LISTA DE TABELAS

Atividade antimicrobiana e efeitos do citral em espécies causadoras de doenças bucais: revisão de literatura

Tabela 1: Estudos selecionados para a revisão de literatura acerca da atividade antimicrobiana do citral para microrganismos de interesse em Odontologia, seu mecanismo de ação e toxicidade..... 51

Atividade antifúngica do citral em espécies de *Candida*: estudo *in silico* e *in vitro*

Tabela 1: Potencial biológico previsto para o citral em alvos moleculares.... 69

Tabela 2: Análise *in silico* do citral com o software Molinspiration..... 70

Tabela 3: Previsão de toxicidade aguda do citral para roedores..... 71

Tabela 4: Atividade antifúngica do citral e de fármacos padrão frente a *Candida* spp (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL)..... 72

Tabela 5: Efeitos do citral e da nistatina sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans* (Valores de média e desvio-padrão da viabilidade dos microrganismos)..... 75

Tabela 6: Valores de CIM (µg/mL) na ausência e presença do sorbitol (0,8M) e ergosterol (100, 200 e 400 µg/mL) sobre cepas de *C.albicans* ATCC 10231..... 76

Avaliação de hidrogel incorporado ao citral para tratamento de candidose bucal

Tabela 1: Média dos halos de inibição (mm) e desvio-padrão para cada concentração de hidrogel a base de citral testada (µg/mL) contra espécies de *Candida*..... 99

Tabela 2: Efeito do hidrogel incorporado com citral (HC 2000 mg/kg), por via oral sobre o peso absoluto (g) e peso relativo (%) de camundongos *Mus musculus* fêmeas..... 105

Tabela 3: Teste de micronúcleo de HC (2000mg/kg) em células de sangue periférico de camundongos e os respectivos controles..... 108

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD = Ágar Sabouraud Dextrose

ATCC = American Type Culture Collection

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CFM = Concentração Fungicida Mínima

CSD = Caldo Sabouraud Dextrose

DMSO = Dimetil-Sulfóxido

HC = Hidrogel incorporado ao citral

OE = Óleo Essencial

UI/mL = Unidades Internacionais por Mililitro

UFC/mL = Unidades Formadoras de Colônias por Mililitro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1 Candidose bucal.....	19
2.2 Mecanismos de resistência de <i>Candida</i> spp aos antifúngicos convencionais.....	20
2.3 Considerações sobre o Citral e sua atividade antimicrobiana sobre <i>Candida</i> spp.....	21
2.4 Sistemas carreadores de fármacos para incorporação de fitoterápicos.....	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 Objetivo Geral.....	25
3. 2 Objetivos Específicos.....	25
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	27
4.1 Delineamento do estudo.....	27
4.2 Local da pesquisa.....	27
4.3 Aspectos éticos.....	27
4.4 Revisão de literatura.....	27
4.5 Ensaios <i>in silico</i>.....	28
4.6 Ensaios de atividade antifúngica <i>in vitro</i>.....	29
4.6.1 Material.....	29
4.6.1.1 <i>Obtenção do citral</i>	29
4.6.1.2 <i>Microrganismos envolvidos e preparo do inóculo</i>	30
4.6.2 Reativação dos microrganismos.....	30
4.6.3 Determinação da atividade antifúngica do citral.....	30
4.6.4 Efeito do citral sobre a cinética do crescimento de <i>Candida albicans</i>	31
4.6.5 Ensaios antifúngicos sobre mecanismos de ação do citral.....	32
4.6.5.1 <i>Ação do citral sobre a parede celular fúngica - ensaio com sorbitol</i>	33
4.6.5.2 <i>Ação do citral sobre a membrana celular fúngica - ensaio com ergosterol</i>	33

4.7 Desenvolvimento do hidrogel a partir do citral (HC)	33
4.7.1 Preparação do hidrogel de Aristoflex AVC com e sem citral.....	33
4.7.2 Incorporação do citral no hidrogel	34
4.8 Ensaios <i>in vitro</i> com o HC	35
4.8.1. Análises físico-químicas do HC.....	35
4.8.1.2 <i>Análise do potencial hidrogeniônico (pH)</i>	35
4.8.1.2 <i>Determinação da resistência à centrifugação</i>	36
4.8.1.3 <i>Determinação da Viscosidade</i>	36
4.8.1.4 <i>Determinação da Espalhabilidade</i>	36
4.8.2 Ação do hidrogel a base de citral (HC) sobre a suscetibilidade microbiana e cinética de crescimento de <i>Candida albicans</i>	37
4.8.2.1 <i>Teste de suscetibilidade microbiana por disco-difusão em ágar</i>	37
4.8.2.2 <i>Cinética de crescimento microbiano sobre C.albicans</i>	39
4.9 Análises <i>in vivo</i> de Toxicidade oral aguda e teste de micronúcleo em camudongos <i>Mus Musculus</i>	40
4.9.1 Toxicidade aguda <i>in vivo</i> do HC em camudongos <i>Mus Musculus</i>	40
4.9.2 Investigação do potencial clastogênico e aneugênico em eritrócitos de camundongos.....	42
5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
6.1 Atividade antimicrobiana e efeitos do Citral em espécies causadoras de doenças bucais: revisão de literatura	46
6.2 Atividade antifúngica do citral em espécies de <i>Candida</i>: estudo <i>in silico</i> e <i>in vitro</i>	60
6.3 Avaliação de hidrogel incorporado ao citral para tratamento de candidose bucal	87
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	116
REFERÊNCIAS	118

1 INTRODUÇÃO

Candidose bucal é uma infecção fúngica oportunista ocasionada por leveduras do gênero *Candida*, sendo *C. albicans* a espécie mais associada a essa doença. Infecção por *Candida* spp. é um grave problema de saúde pública, pois há uma crescente resistência dos fungos aos fármacos disponíveis no mercado e alta taxa de recidivas. A candidemia é uma das infecções nosocomiais mais frequente a nível mundial e está associada à alta morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento (KAUR; CHAKRABARTI, 2017; KHEDRI et al., 2018; TREVIÑO-RANGEL et al., 2018).

Espécies de *Candida* vivem como comensais na microbiota bucal, e sob condições específicas, com o comprometimento da imunidade, podem se tornar patogênicas e ocasionar a candidose bucal. Além de *Candida albicans*, outras espécies são relacionadas a essa doença como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (CHOUHAN et al., 2019; HOSAIN POUR et al., 2019; MIRANDA-CADENA et al., 2018a; QUINDOS et al., 2019a). A alta incidência de *Candida* não-albicans exige um controle mais efetivo da infecção, pois são espécies mais resistentes à terapia antifúngica e prolongam o processo de reparação da mucosa bucal às terapias antifúngicas (JAHANSHIRI et al., 2018; SANTOS et al., 2018).

Candidose bucal apresenta alta prevalência em pacientes com imunossupressão dentre eles: diabéticos (CHOUHAN et al., 2019), HIV positivos (HOSAIN POUR et al., 2019; KIRTI, 2019), oncológicos (KAWASHITA et al., 2018), asmáticos os quais necessitam de tratamento com corticosteroides. É frequente em pacientes reumáticos, especialmente em pacientes idosos, com longa duração de internação hospitalar (HOU et al., 2019); e portadores de doenças renais crônicas (KESMEZ et al., 2020). Além disso, afeta usuários de próteses removíveis, com prevalência variando entre 35% a 75% (IOSIF et al., 2016; LIMA et al., 2012; REINHARDT et al., 2018; YARBOROUGH et al., 2016).

O tratamento inicial é feito com um agente tópico (nistatina ou miconazol), caso essa terapia não apresente resultados, é iniciado o tratamento sistêmico, sendo o fluconazol o fármaco mais prescrito. As três principais classes de antifúngicos utilizadas são: os azólicos (fluconazol e itraconazol), polienos (nistatina e anfotericina B) e equinocandinas (micafungina, caspofungina). Esses medicamentos apresentam

sérios problemas relacionados à eficácia, toxicidade, baixa potência e farmacocinética inadequada (SCOTTI et al., 2012), além de apresentar efeitos colaterais e/ou adversos.

Pesquisas recentes sugerem que mecanismos de resistência dos fungos envolvem alterações no alvo molecular do fármaco, super-expressão de bombas de efluxo, alterações na biossíntese do ergosterol, perda de porinas, “sobre expressão” da molécula alvo e produção de enzimas fúngicas que degradam o fármaco (BERMAN; KRYSAN, 2020; LEE et al., 2020; MBA; NWEZE, 2020; PRASAD; NAIR; BANERJEE, 2019). O diagnóstico de infecções por *Candida* resistentes a antifúngicos é fundamental para o manejo bem-sucedido de pacientes com essas infecções (MBA; NWEZE, 2020).

Por estas razões, novos fármacos e outras terapias são necessários para o tratamento dessas infecções (FREIRE et al., 2017; IOSIF et al., 2016; LIMA et al., 2012). Na Odontologia, produtos naturais obtidos a partir de plantas medicinais tem sido alvo de estudos quanto às suas propriedades farmacológicas e potencial antifúngico. A fitoterapia se apresenta como terapia alternativa promissora devido a sua diversidade molecular, redução de efeitos adversos, baixa toxicidade e fácil acesso à população (ALMEIDA et al, 2018; LAVAAEE et al., 2019; SILVA et al., 2019).

O citral é um fitoconstituente presente em diversos óleos essenciais utilizados pela população, como o *Cymbopogon citratus*. Algumas de suas propriedades farmacológicas tem sido relatadas na literatura como antitumoral (XIA et al., 2013), broncodilatadora (MANGPRAYOOL; KUPITTAYANANT; CHUDAPONGSE, 2013), antiprotozoária (CARDOSO; SOARES, 2010) e antimicrobiana (FREIRE et al., 2017; LEITE et al., 2014; LIMA et al., 2012; ZORE et al., 2011). Porém, sua ação farmacológica precisa ser elucidada e não há na literatura pesquisas *in vivo* que verifiquem a eficácia do citral no tratamento da candidose bucal.

Nos últimos anos a procura por novos sistemas carreadores de fármacos tem sido muito relevante no sentido de se estabelecer alternativas terapêuticas mais eficientes, que possibilitem administrar os fármacos com mais segurança e com efeitos adversos minimizados. Nesse contexto, o presente estudo realizou uma revisão de literatura sobre o composto, avaliou *in silico* a ação biológica e *in vitro* a atividade antifúngica do citral isolado sobre *Candida ssp*, bem como a cinética de crescimento e seu mecanismo de ação. Além de desenvolver um hidrogel incorporado ao citral (HC), realizou a caracterização físico-química e avaliou, *in vitro* a

susceptibilidade microbiana sobre *Candida* ssp. E ainda analisou *in vivo* a toxicidade aguda e a mutagenicidade deste hidrogel em camudongos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Candidose bucal

Candida spp se encontra na microbiota bucal de indivíduos saudáveis, porém, uma variedade de fatores sistêmicos e locais pode ocasionar o estado patológico da candidose bucal (HU et al., 2019; MBA; NWEZE, 2020; MIRANDA-CADENA et al., 2018a). A candidose bucal é prevalente em pacientes diabéticos (MARTORANO-FERNANDES et al., 2020) e imunocomprometidos como HIV/AIDS (HU et al., 2019), assim como em pacientes reumáticos e renais crônicos (KESMEZ et al., 2020).

A espécie de *Candida* mais comumente encontrada na microbiota bucal é *C. albicans*, devido às suas propriedades de aderência e maior nível de patogenicidade. *C. albicans* é uma levedura dimórfica, que pode existir em ambas as formas de hifas e leveduras, dependendo do ambiente. *C. albicans* é isolada em mais de 80% das lesões orais. Outras espécies que foram implicadas incluem *C. dubliniensis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. stellatoidea* e *C. tropicalis*. *Candida albicans* é o principal agente etiológico de candidose bucal, mas *C. glabrata* e *C. parapsilosis* são consideradas causas emergentes dessa doença por diminuir a susceptibilidade aos agentes antifúngicos atuais, apresentar resistência e prolongar o processo de reparação da mucosa bucal às terapias antifúngicas (MILLSOP; FAZEL, 2016; MIRANDA-CADENA et al., 2018b; SANTOS et al., 2018).

A candidose bucal frequentemente produz desconforto, dor e apresenta uma ampla variedade de manifestações clínicas agudas e crônicas, dentre as quais: lesões brancas ou eritematosas. A primeira inclui candidose pseudomembranosa e hiperplásica. A forma eritematosa é caracterizada por lesões vermelhas: candidose atrófica aguda, atrófica crônica, glossite romboide mediana, queilite angular e eritema gengival linear. Além disso, existem três formas de candidose bucal que não se encaixam nessas categorias clínicas: candidose mucocutânea crônica, queilocandidose e candidose multifocal crônica (MILLSOP; FAZEL, 2016; MIRANDA-CADENA et al., 2018b).

As infecções invasivas por *Candida* continuam sendo uma causa importante de morbidade e mortalidade, especialmente em pacientes hospitalizados e

imunocomprometidos ou em estado crítico. A incidência de candidose nos últimos anos provêm do crescente número de indivíduos imunocomprometidos, da disseminação do uso de antibióticos de amplo espectro e ao aumento da prevalência de candidose causada por espécies não-albicans, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*. Estas espécies estão mais intimamente relacionadas a uma maior taxa de mortalidade e resistência antifúngica que *C. albicans* (ARENDRUP; PATTERSON, 2017).

Diante da recorrência e resistência dessa infecção aos antifúngicos convencionais, terapias complementares são estudadas para seu tratamento.

2.2 Mecanismos de resistência de *Candida* spp aos antifúngicos convencionais

Candida spp apresenta diferentes formas de resistência frente aos antifúngicos convencionais. Estudos comprovaram haver interação entre bactérias e fungos observando um aumento da aderência de *C. albicans* na presença de estreptococos (CHEVALIER et al., 2018; MORSE et al., 2019).

A patogenicidade de *C. albicans* relaciona-se com a sua capacidade de formar biofilmes em uma variedade ampla de superfícies, para crescer e proliferar como hifas, produzir e secretar enzimas proteolíticas, e prejudicar a resposta imune do hospedeiro (PRASAD; NAIR; BANERJEE, 2019).

Um dos mecanismos de resistência de *Candida* aos azóis é a capacidade de ativação de bombas de efluxo que promovem a exocitose do fármaco e diminui a sua concentração na enzima-alvo. A alteração da enzima-alvo ou sobre expressão do gene que a codifica – *ERG11* – constitui um outro mecanismo que confere resistência aos azóis. Assim como, a capacidade de *Candida* spp produzir vias alternativas para compensar a perda de ergosterol induzida pelos azóis (BERMAN; KRYSAN, 2020; PRISTOV; GHANNOUM, 2019).

Os mecanismos de resistência às equinocandinas baseiam-se na ocorrência de mutações pontuais adquiridas nos genes *FKS* que codificam a enzima 1,3-β-D-glucanosintetase, em regiões denominadas “*hot-spot*”, o que leva a uma diminuição da sua sensibilidade, associado a valores elevados de Concentração Inibitória Mínima/CIM e consequente falha terapêutica (BEYDA; LEWIS; GAREY, 2012; CUENCA-ESTRELLA, 2010). Poderão existir também casos de mutações intrínsecas, em que a forma alterada da enzima não tem tanta afinidade para o fármaco. A indução

de uma resposta adaptativa ao *stress* constitui um outro mecanismo de resistência, isto é, em função da inibição da síntese de glucano, a parede celular tem a capacidade de produzir outros componentes (por exemplo, quitina) (COWEN; STEINBACH, 2008; SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLÖRL, 2015). Esta resposta leva a um aumento da concentração de quitina na parede celular e efeito de crescimento incompatível *in vitro*, ou seja, a capacidade de crescimento acima da CIM (WALKER; GOW; MUNRO, 2010).

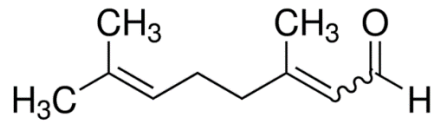
A resistência adquirida aos polienos está relacionada com mutações que ocorrem no gene *ERG3*, cujas enzimas participam na síntese de ergosterol. Estas mutações afetam a biossíntese deste componente, podendo ocorrer modificações nos lípidos de membrana e um decréscimo na quantidade sintetizada (BERMAN; KRYSAN, 2020). *Candida* spp apresenta um outro mecanismo de resistência à anfotericina B que consiste num aumento da produção de catalases, respondendo desta forma ao *stress* oxidativo induzido pelo fármaco (PEMÁN; CANTÓN; ESPINEL-INGROFF, 2009).

A resistência de *Candida* aos antifúngicos é multifatorial, e diversos fatores devem ser considerados quando da escolha da terapêutica (ARENDRUP; PATTERSON, 2017). Além disso, a limitação da eficácia e a restrição da dosagem de drogas sintéticas indicam a necessidade de encontrar medicamentos novos e naturais para o tratamento da candidose bucal (CHATRATH et al., 2019).

2.3 Considerações sobre o Citral e sua atividade antimicrobiana sobre *Candida* spp

Citral, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$ (3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 1), é o nome dado a uma mistura natural de dois aldeídos de monoterpenos acíclicos isoméricos: geranial (*trans*-citral, citral A) e neral (*cis*-citral, citral B). É o constituinte básico do capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Está presente em óleos de várias plantas como murta de limão (*Backhousia citriodora*), lúcia-lima (*Aloysia citrodora*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e laranja (*Citrus sinensis*) (CHATRATH et al, 2019).

Figura 1: Fórmula estrutural do citral.



Suas propriedades farmacológicas são relatadas na literatura como antitumoral (XIA et al., 2013), broncodilatadora (MANGPRAYOOL; KUPITTAYANANT; CHUDAPONGSE, 2013), antiprotozoária (CARDOSO; SOARES, 2010; MORENO et al., 2018) e antimicrobiana (CHATRATH et al, 2019; FREIRE et al, 2017; LEITE et al, 2014; LIMA et al, 2012; ZORE et al, 2011). Este fitoconstituente é ativo contra o HSV-1 *in vitro* e tem ação anti-inflamatória, bloqueando a via do NF-κB (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Silva et al. (2008) estudaram a atividade antifúngica do óleo de citronela e citral e constataram potencial *in vitro* contra espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*. Zore et al. (2011) avaliaram o potencial anti-*Candida* de seis terpenoides (linalol, citral, eugenol, citronelol, benzoato de benzila e acetato de linalol), os quais demonstraram boa atividade contra *Candida* spp, sendo o linalol e citral os mais eficazes, inibindo todos os isolados de *C. albicans* e não *albicans* (*C. parapsilosis*, *C. blankii*, *C. kefer* e *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*). Nessa pesquisa, o citral apresentou atividade fungicida e sinérgica ao uso do fluconazol. Acredita-se que a atividade sinérgica seja devido a mudanças na fluidez da membrana, interferência com proteínas de sinalização ligadas a membrana e aumento do influxo de fluconazol. O citral interrompeu a fase S do ciclo celular da *C. albicans*.

Khan e Ahmad (2012) pesquisaram a atividade antibiofilme de quatro fitocompostos (cinamaldeído, citral, eugenol e geraniol) e sua sinergia com fluconazol e anfotericina B contra biofilmes pré-formados de *C. albicans*. Entre os resultados obtidos, o citral inibiu a formação de biofilmes, porém sendo menos eficaz que o cinamaldeído e geraniol.

Em um estudo sobre a atividade contra *C. albicans*, Lima et al. (2012) verificaram que o citral possui efeito fungistático e fungicida sobre essa levedura, porém seu mecanismo de ação não foi determinado. Os autores realizaram testes

sobre ergosterol e sorbitol e concluíram que o fitoconstituente não agiu sobre a parede e membrana celular fúngica.

Leite et al. (2014) analisaram a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do citral frente cepas de *C. albicans*, concluindo que o envolvimento com a parede celular e a ligação ao ergosterol não são possíveis mecanismos de ação, e demonstraram seu potencial antifúngico contra as cepas de *C. albicans*. Os autores ressaltaram a necessidade de mais estudos sobre seus efeitos biológicos antes de ser utilizado como componente em novos medicamentos antifúngicos.

Chatrath et al. (2019) estudaram a ação do citral e timol sobre *C. tropicalis* e seu biofilme. O estudo realizado verificou que o citral apresentou atividade antifúngica moderada contra *C. tropicalis*. Observou-se que citral como um agente antifúngico, atinge a membrana celular. Os autores recomendam que mais pesquisas sejam realizadas para verificar as diversas vias envolvidas na sobrevivência das células após o tratamento com diferentes agentes antifúngicos e assim buscar novas alternativas de terapias (CHATRATH et al., 2019).

As pesquisas na literatura sobre a atividade antifúngica do citral em espécies de *Candida* ainda são escassas. Seu mecanismo de ação precisa ser elucidado, assim como sua toxicidade e mutagenicidade. Além disso, não existe um sistema que incorpore esse fitoconstituente com o objetivo de tratamento da candidose bucal.

2.4 Sistemas carreadores de fármacos para incorporação de fitoterápicos

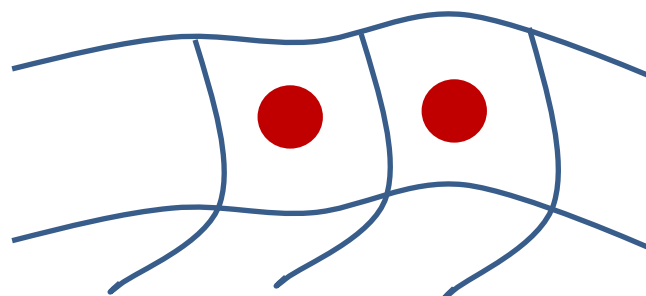
O uso de hidrogéis na liberação de biocidas tem sido explorado devido à sua biocompatibilidade, facilidade de encapsulação de fármacos e potencial para conferir propriedades mecânicas e estruturais semelhantes ao tecido biológico (SERRA et al., 2020). Para a administração tópica de medicamentos, os hidrogéis bioadesivos são ideais, pois podem fornecer liberação prolongada de agentes terapêuticos, como antimicrobianos, para a mucosa bucal (KONG et al., 2016a).

Estudos observam a relação entre a formulação e a atividade antimicrobiana de compostos bioativos, demonstrando o potencial que esses compostos possuem quando incorporados aos sistemas carreadores de fármacos fornecendo uma nova forma de terapia antimicrobiana (ALKHALIDI; HOSNY; RIZG, 2021; KONG et al., 2016a; LU et al., 2018; SERRA et al., 2020).

Os hidrogéis são caracterizados por uma rede polimérica 3D que permite que o líquido e as moléculas se difundam (Figura 2). A difusão do medicamento depende do tamanho da malha: se o tamanho da malha for maior que o do medicamento, as moléculas estão livres para migrar através da rede, enquanto se o tamanho do medicamento for comparável ao tamanho da malha, o medicamento está fisicamente aprisionado ao hidrogel (LI; MOONEY, 2016). No entanto, o tamanho da malha pode mudar com o tempo, permitindo a liberação do medicamento. Dois fenômenos principais podem levar a mudanças na rede polimérica 3D: degradação e intumescimento. A degradação, uma perda de massa do polímero, pode ser mediada pela atividade enzimática ou por hidrólise. A degradação resulta em um aumento do tamanho da malha que permite a difusão do medicamento. Da mesma forma, o inchaço devido à absorção de água aumenta o tamanho da malha e permite a liberação do medicamento (LI; MOONEY, 2016). Em geral, a difusão e a liberação do medicamento são afetadas por diferentes parâmetros, como a hidrofiliabilidade/hidrofobicidade do medicamento, a área de superfície e a geometria do hidrogel, o tipo e o volume do solvente, a degradação do hidrogel, o tamanho da malha e taxa de intumescimento (CACCAVO et al., 2015).

Os sistemas de entrega de hidrogel podem alavancar resultados terapêuticamente benéficos da entrega de compostos ativos. Os hidrogéis podem fornecer controle espacial e temporal sobre a liberação de vários agentes terapêuticos, incluindo drogas de moléculas pequenas, drogas macromoleculares e células. Devido às suas propriedades físicas ajustáveis, degradabilidade controlável e capacidade de proteger drogas lábeis de degradação, os hidrogéis servem como uma plataforma na qual várias interações físico-químicas com medicamentos encapsulados controlam sua liberação (LI; MOONEY, 2016).

Figura 2: Ilustração esquemática de rede polimérica de hidrogel com substância ativa em seu interior.



Fonte: Próprio autor.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse estudo avaliou *in silico* e *in vitro*, a atividade antifúngica do citral isolado sobre *Candida ssp*, e incorporado a um hidrogel, bem como analisou as propriedades físico-químicas, ação antifúngica e toxicológica deste hidrogel.

3.2 Objetivos específicos

- Realizar uma revisão bibliográfica acerca de pesquisas sobre a ação do citral em microrganismos causadores de doenças bucais;
- Verificar através de ensaio *in silico* o potencial biológico do citral em espécies de microrganismos de interesse para Odontologia, assim como a biodisponibilidade oral teórica desse composto e a toxidez oral aguda em ratos em diferentes vias de administração;
- Avaliar a atividade antifúngica do citral por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) sobre cepas de coleção de referência e isolados clínicos de fungos do gênero *Candida*;
- Determinar, por meio da curva de time-kill, a ação do citral sobre a cinética de crescimento de cepa de referência e clínica de *C. albicans*;
- Avaliar o mecanismo de ação do citral sobre a biossíntese de parede celular e permeabilidade iônica da membrana de *C. albicans*;
- Desenvolver um hidrogel incorporado ao citral (HC) para o tratamento de candidose bucal;
- Caracterizar o hidrogel incorporado ao citral através da realização de análises físico-químicas aplicadas em formulações farmacêuticas como: determinação de ph, viscosidade e espalhabilidade;
- Avaliar, *in vitro*, a atividade antifúngica do HC sobre cepas de coleção de referência de fungos do gênero *Candida*, por meio do teste de suscetibilidade microbiana disco-difusão em ágar;
- Determinar a cinética de crescimento de *C. albicans* frente à ação do HC;
- Avaliar a toxicidade aguda *in vivo* do HC em camundongos;

- Avaliar o potencial clastogênico e aneugênico do HC por meio do teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Delineamento do estudo

Trata-se de uma pesquisa aplicada, quantitativa do tipo experimental, *in silico*, *in vitro* e *in vivo* que adotou um modelo de pesquisa animal de roedores, sendo caracterizado como estudo *in vivo* controlado e randomizado.

4.2 Local da pesquisa

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Análises e Diagnóstico (LAD) do Departamento de Odontologia da UEPB.

O desenvolvimento da formulação HC foi realizado no Laboratório da Farmafórmula LTDA, João Pessoa, Paraíba.

A caracterização físico-química do HC foi realizado no Laboratório de Desenvolvimento e Caracterização de Produtos farmacêuticos (LDCPF) – UEPB.

Os testes de avaliação do potencial clastogênico e aneugênico, de toxidez foram realizados no Centro Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba e no Laboratório de Histopatologia Oral da UEPB.

4.3 Aspectos éticos

A presente pesquisa foi avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UEPB e registrado na Plataforma Brasil no site do Ministério da Saúde, sob número do parecer 4.052.716. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPB, sob número de parecer 009/2021.

4.4 Revisão de literatura

Realizou-se uma revisão de literatura do tipo integrativa para estudo da atividade antimicrobiana do citral, seu mecanismo de ação e efeitos toxicológicos.

Os critérios utilizados para seleção da amostra foram: artigos publicados nos bancos de dados da Literatura Internacional em Ciências da Saúde – Medline (Pubmed), Science Direct e Scielo. Os seguintes descritores foram utilizados: “Citral”

OR “Citral AND Antimicrobial activity” OR “Citral AND Antifungal activity” OR “Citral AND toxicity” OR “Citral AND Dentistry”.

O período de publicação dos artigos durante a realização das buscas foi constituído pelos últimos 15 anos. Foram incluídas pesquisas que abordaram ensaios com o citral frente aos microrganismos de interesse para a Odontologia e sua toxicidade, nas seguintes linguagens: português, espanhol e inglês. Foram excluídas as teses e dissertações, assim como estudos que não abordaram o tema proposto.

Para elaboração desta revisão determinou-se: tema; objetivo; critérios de inclusão e exclusão dos artigos; definição das informações a serem observadas nos artigos selecionados; busca dos artigos. Foi realizada a leitura dos títulos e resumos dos estudos. Após análise e seleção de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, fez-se a leitura dos textos na íntegra para avaliação dos resultados obtidos e elaboração da discussão e conclusão da presente revisão de literatura.

4.5 Ensaio *in silico*

Para os ensaios *in silico* o desenho da molécula foi realizado no programa Chemdraw (<http://www.chemspider.com/>), o qual fornece as informações químicas referente a molécula estudada. A partir desses dados seguiu-se aos estudos *in silico* propostos nessa pesquisa.

A análise da probabilidade do desenvolvimento de propriedades farmacológicas do monoterpeno em estudo foi feita através do *PASS ONLINE*[®], software projetado como uma ferramenta para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula semelhante a um fármaco orgânico. O *PASS* fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividade biológica com base na estrutura dos compostos orgânicos. O *programa* fornece características da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (Srinivas et al., 2014).

Para avaliação dos parâmetros farmacológicos, foi analisado a biodisponibilidade oral teórica do produto, pela “Regra dos Cinco” de Lipinski, que estabelece que pelo menos três de quatro requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade. Assim, para que compostos

sejam absorvidos, devem possuir miLogP menor ou igual a 5,00; MM menor ou igual a $500 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$; Área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 \AA^2 ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH), expresso pela soma de OH e NH na molécula (LIPINSKI et al., 2001). Para esta predição, foi empregado o programa Molinspiration Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

Os parâmetros toxicológicos foram avaliados através da toxicidade oral aguda em ratos pelo programa GUSAR (General Unrestricted Structure–Activity Relationships) (<http://www.way2drug.com/gusar/acutoxpredict.html>). Esta ferramenta cria modelos QSAR/QSPR com base em semelhanças químicas entre compostos com efeitos tóxicos conhecidos e a presença de fragmentos tóxicos (Ghannay et al., 2020). A toxicidade oral aguda foi classificada com base nas categorias da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) que divide os compostos de acordo com seu valor de DL50 (conhecida como a dose letal mediana). A categoria I contém os compostos com valores de DL50 inferior ou igual a 5 mg/kg , a Categoria II contém compostos com valores DL50 superiores a 5 mg/kg e inferior a 50 mg/kg , a Categoria III inclui compostos com valores DL50 superiores a 50 mg/kg e inferior a 300 mg/kg , a Categoria IV consiste de compostos com valores DL50 superiores a 300 mg/kg e inferior a 2000 mg/kg e a categoria V, valores superiores a 2000 e inferior a 5000 mg/kg .

4.6 Ensaios de atividade antifúngica *in vitro*

4.6.1 Material

4.6.1.1 Obtenção do citral

O citral foi a substância requerida para o objeto de estudo dessa pesquisa. O medicamento licenciado utilizado para a execução dos testes foi a nistatina e fluconazol. Ambos adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP). Para a realização dos ensaios farmacológicos, o citral foi solubilizado em Tween 80 a 2% e Dimetil-

Sulfóxido (DMSO) em uma proporção de até 10%, completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 5 mL) (HOOD et al., 2003; CLEENLAND, SQUIRES, 1991).

4.6.1.2 *Microrganismos envolvidos e preparo do inóculo*

Foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (22019), provenientes da Fundação Oswaldo Cruz/RJ e isolados clínicos: *Candida albicans* (A4, A5 e A6).

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008). O inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) com comprimento de onda de 530nm e absorvância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração de 5×10^6 UFC/mL. Nos poços da microplaca, durante os testes de atividade antimicrobiana, esta concentração resultou em $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

4.6.2 *Reativação dos microrganismos*

As cepas de coleção de cultura e de isolados clínicos foram reativados a partir de sua cultura original em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubada a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de Caldo Sabouraud Dextrose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após incubação a 37°C , por 24 h, o conjunto foi centrifugado e as células ressuspensas em 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, a concentração de células foi determinada com auxílio de espectrofotômetro, utilizando-se o comprimento de onda de 530 nm. A densidade celular foi estabelecida na absorvância de 0,1, equivalente a concentração de $5,0 \times 10^6$ células/mL (CLSI, 2008).

4.6.3 *Determinação da atividade antifúngica do citral*

A atividade antifúngica do citral foi determinada segundo a normatização M27-A3 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), por meio da técnica da

microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A partir desta, foram obtidas a CIM e a CFM do citral frente às cepas de coleção de cultura e de isolados clínicos.

Microplacas de fundo chato com 96 poços (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas inserindo-se 100 µL de meio de cultura (Caldo Sabouraud Dextrose) em todos os poços. Em seguida, 100 µL das diluições do citral (1000 µg/mL) foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca. Diluições seriadas (1:2) foram então realizadas por meio da transferência de 100 µL aos poços subsequentes. Em seguida, 100 µL da suspensão dos microrganismos (diluído 1000x em caldo Sabouraud Dextrose) na concentração 5×10^3 UFC/mL foram inseridos em todos os poços. Desse modo, foram testadas as concentrações para o citral entre o intervalo de 1000 µg/mL e 7,8 µg/mL. Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços), e do veículo (DMSO 5% e Tween 80 2%) foram realizados para garantir acurácia do método. Controles farmacológicos com nistatina e fluconazol (controle positivo) foram realizados nas concentrações que variam de 64 a 0,5 µg/mL.

As placas serão foram incubadas a 35 ± 2 °C, por 24 h, em aerobiose. Após esse período, a CIM foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados. A viabilidade dos microrganismos foi determinada pela utilização do corante resazurina (3 mM), o qual foi pipetado (50 µL) em todos os poços após o período de incubação para determinação da CIM (24 h). A metabolização do corante pelos microrganismos viáveis resultou na produção de um pigmento de cor rosa.

A CFM foi determinada pela semeadura (10 µL) em placas de Ágar Sabouraud Dextrose, dos poços correspondentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM. Após semeadura, as placas foram incubadas a 35°C por 24 h. A CFM foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos subcultivos. Essas análises foram realizadas em triplicata em dias independentes.

4.6.4 Efeito do citral sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans*

O efeito do citral sobre a cinética do crescimento foi determinado pela curva de *time-kill*, segundo metodologia proposta por Klepser et al. (1997), Cantón et al. (2009) e de Castro et al. (2013) com modificações.

Foi utilizado nesse teste cepa de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231) e isolado clínico *C.albicans* A6. O preparo do inóculo foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008), conforme descrito previamente. Após a obtenção do inóculo, e diluições sucessivas, obteve-se suspensões dos microrganismos equivalentes a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Microplacas com 96 poços de fundo chato foram preparadas, inserindo-se 100 μ L de meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca, 100 μ L do citral (1000 μ g/mL), assim como para o controle farmacológico a Nistatina (256 μ g/mL). Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços) e controle do veículo (diluyente do citral: DMSO e Tween 80) também foram realizados e avaliados para garantir acurácia do método. Após a adição das substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 μ L de alíquotas da primeira fileira de poços aos subsequentes. E em seguida, 100 μ L da suspensão dos microrganismos diluído em Caldo Sabouraud Dextrose na concentração $2,5 \times 10^3$ UFC/mL foram inseridas em todos os poços. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37°C, por 24 h, em aerobiose (CLSI, 2008).

Para esse teste, as concentrações avaliadas para o citral e nistatina corresponderam aquelas equivalentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM μ g/mL. Foi realizada a semeadura de alíquotas de 10 μ L em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose nos intervalos de tempo de 0 (momento inicial), e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio. Após a coleta, as microplacas e placas de Petri foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por um período de 24h. Decorrido esse período, o número de microrganismos viáveis (UFC/mL) foi avaliado para cada concentração e tempo de análise. Desse modo, por meio deste teste, determinou-se o efeito das substâncias analisadas, segundo a sua concentração e o tempo de ação exercido sobre *Candida albicans*.

4.6.5 Ensaio antifúngico sobre mecanismos de ação do citral

Testes foram realizados para comprovar o efeito antifúngico do citral, em relação a sua interação direta com a estrutura da parede celular de *C. albicans* (ensaio com sorbitol) ou da permeabilidade iônica da membrana (ensaio com ergosterol).

4.6.5.1 Ação do citral sobre a parede celular fúngica - ensaio com sorbitol

A CIM do citral foi determinada na presença e ausência de sorbitol (protetor osmótico) pela técnica da microdiluição. Inicialmente, 100µL de CSD foram colocados em cada poço da placa. Subsequentemente, 100µL do citral foram transferidos para o primeiro poço e sequencialmente diluídos em razão de 2, obtendo concentrações entre 1000 e 0,48µL/mL. Finalmente, 100µL do inóculo ($2,5 \times 10^5$ UFC/mL) preparado com Caldo Sabouraud Dextrose previamente suplementado com sorbitol (concentração final de 0,8M) foram transferidos para cada poço. O crescimento fúngico, esterilidade do meio e veículo também foram controlados. A caspofungina foi utilizada como controle positivo. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C e feita a leitura entre o período de 48 horas e 7 dias após (FROST et al., 1995).

4.6.5.2 Ação do citral sobre a membrana celular fúngica - ensaio com ergosterol

Para determinar a interação do citral com o ergosterol, a CIM foi determinada sobre *C. albicans* pelo método da microdiluição na presença e ausência de ergosterol exógeno em concentrações de 100, 200 e 400µL/mL. A nistatina e anfotericina B foram utilizadas como controle positivo. O veículo como controle negativo e a viabilidade do fungo na presença de ergosterol também foram observados. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas e após esse período foi realizada a leitura (ESCALANTE et al., 2008).

4.7 Desenvolvimento do hidrogel incorporado ao citral (HC)

4.7.1 Preparação do hidrogel de Aristoflex AVC com e sem citral.

O hidrogel foi obtido levando em consideração a proporção peso/volume em porcentagem. Os parabenos foram dissolvidos em propilenoglicol, adicionada a água aquecida até 70°C, agitando até completa dissolução. Após retirada do aquecimento e, sob agitação moderada, uma solução 2,5% (m/v) de Aristoflex AVC foi preparada dissolvendo-o (2,5g) em água ultrapurificada (q.s.p. 100 mL) até completa dispersão do gel. Em seguida, o gel foi resfriado até 40°C e adicionado o Phenonip (Quadro 1) (FERREIRA, 2008).

Posteriormente, diferentes proporções (m/v) do citral foram adicionadas ao hidrogel, com o intuito de verificar a capacidade máxima de incorporação do hidrogel sem alterar suas características físico-químicas.

Quadro 1: Composição da base do hidrogel formulado.

Código Fornecedor	Produto	Lote	Qtde
1005732	Hidrogel	-	100 qsp(ml)
1002680 Mapric Prod.Farmacocos	Aristoflex AVC	AUTO300421	2,5%
1002574 Purifarma	Silicone DC 9040	H052K7F071	3%
1001999 All Chemistry	Silicone 245	065490	3%
1001001 Chemyunion Ltda.	Phenonip	CN010-0520	1%
1004042 Farmaformula	Água destilada	128	100 qsp (ml)

Fonte: Próprio autor.

4.7.2 Incorporação do citral no hidrogel

Acrescentou-se o citral ao hidrogel na concentração desejada (CIM: 62,5 µg/mL). Para definição da quantidade de microlitros do composto que seria necessário incorporar ao hidrogel na concentração almejada foram realizadas as seguintes etapas:

Etapa 1: Calcular a densidade relativa contida no hidrogel conforme a seguinte equação:

$$drel = (Pamostra - Pvazio) \div (P\acute{a}gua - Pvazio)$$

Considere:

drel= densidade relativa

Pvazio= peso do picnômetro vazio

Pamostra= peso da amostra

P\acute{a}gua= peso de \acute{a}gua

Constatou-se a densidade relativa 852 g/L.

Etapa 2: Colocar o volume presente na massa em 10 g de hidrogel com a densidade relativa 852g/L.

$$d = m \div v$$

$$\frac{852g}{L} = \frac{10g}{v}$$

$$v = 0,0117L \text{ ou } 11,7\mu L$$

Etapa 3: calcular o volume de citral a ser adicionado na massa de 10 g de hidrogel para obter um volume final de 11,7 μ L. O peso molecular do citral é 152,23 g/mol=152,23 mg/mL. Como é uma solução bastante concentrada, inicialmente faz-se uma diluição de 1:10.

O cálculo do volume segue a equação:

$$C1V1 = C2V2$$

$$\frac{15,223 \text{ mg}}{\text{mL}} V1 = \frac{0,0625 \text{ mg}}{\text{mL}} \times 11,7 \text{ mL}$$

$$V1 = 0,048 \text{ mL ou } 48 \mu L$$

Após definição do volume de citral a ser adicionado à base de hidrogel, passou-se à etapa de homogeneização do composto na base com o auxílio de grau e pistilo, realizando movimentos circulares até a sua completa incorporação. O produto finalizado foi envasado em um recipiente adequado para proteção da luz e umidade.

4.8 Ensaio *in vitro* com o HC

4.8.1. Análises físico-químicas do HC

4.8.1.1 Análise do potencial hidrogeniônico (pH)

A análise de pH da formulação foi realizada em pHmêtro digital, GEHAKA previamente calibrado com soluções tampão de fosfato e biftalato pH 7,0 e 4,0. A formulação foi diluída na proporção de 1:10 em água purificada, e o eletrodo foi inserido diretamente, sob temperatura ambiente (25°C) para verificação do potencial

hidrogeniônico da formulação em relação ao tempo, conforme a orientação da ANVISA para produtos semissólidos (BRASIL, 2004; DAMASCENO et al, 2012).

4.8.1.2 Determinação da resistência à centrifugação

Para determinação da resistência à centrifugação das amostras, foi realizada de acordo com o Guia de estabilidade de cosméticos da ANVISA. Amostras de 2,0 g foram centrifugadas à 5.000 rpm durante 30 minutos. O teste produziu estresse nas formulações, simulando um aumento de fora de gravidade, podendo antecipar possíveis instabilidades, acelerando o aparecimento dessas (BRASIL, 2004; FORMARIZ et al, 2010).

4.8.1.3 Determinação da viscosidade

Para avaliação da viscosidade empregou-se o viscosímetro rotativo digital de BROOKFIELD, da Fungilab Viscolead, modelo One, no qual a amostra foi medida por velocidade de rotação de eixo metálico, com cone coaxial *spindle* R7, imerso no material. Uma quantidade de 10 g de amostra, após verificação da ausência de bolhas, sob temperatura ambiente (25°C), foi acondicionada em frasco de polietileno cristal. A análise foi realizada, sob agitação rotacional variável, sob velocidade de rotação descendente. A leitura foi realizada, em triplicata, com valor em centipoise (cP), de acordo com a capacidade de leitura do aparelho (KONG et al, 2016).

4.8.1.4 Determinação da espalhabilidade

Para determinar a espalhabilidade das amostras, uma placa circular de vidro, com diâmetro de (20 cm x 20 cm) e 0,2 mm de espessura, foi colocada sobre outra placa de suporte de mesma largura, entre ambas as placas, foi posicionado uma folha de papel milimetrado e em seguida adicionado uma terceira placa, com orifício central de 1,2 cm de diâmetro. A amostra foi introduzida no orifício da placa e a superfície nivelada com uma espátula. Após a aplicação da amostra retirou-se completamente esse molde e sob esse material, foi disposto uma placa, com peso pré-determinado. Após 1 minuto, foi calculada a superfície abrangida através da medição do diâmetro em duas posições opostas, calculando o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido, com a adição de 10 placas adicionadas sobre a amostra. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso adicionado. As

análises foram realizadas em triplicata. A equação 1 foi utilizada para os cálculos de espalhabilidade (WATHONI et al., 2020).

$$Ei (max) = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

Ei: é a espalhabilidade da amostra para o peso i, em mm²;

d : é o diâmetro médio, em milímetros.

4.8.2 Ação do hidrogel incorporado ao citral (HC) sobre a suscetibilidade microbiana e cinética de crescimento de *Candida albicans*

4.8.2.1 Teste de suscetibilidade microbiana por disco-difusão em ágar

O teste de difusão em disco aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) foi realizado para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana, de acordo com recomendações do CISI (2009a), com adaptações (BARRY; THORNSBERRY; BARRY, 1991). O ensaio foi realizado em triplicata e em dias alternados.

Foi utilizado para os testes o meio Ágar Saboroud Dextrose (ASD), preparado de acordo com especificações do fabricante, placas de Petri de 100x15mm de modo a possibilitar uma camada de 4mm de ágar. Foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (22019), provenientes da Fundação Oswaldo Cruz/RJ e isolados clínicos: *Candida albicans* (A4, A5 e A6). As concentrações testadas do HC foram de 62,5 µg/mL a 2500 µg/mL, e da nistatina variaram entre 8 µg/mL a 64 µg/mL.

Para o teste de disco-difusão em ágar, a suspensão de leveduras foi preparada em solução salina fisiológica (NaCl 0.85%) com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland (5×10^6 células/mL). As placas foram inoculadas através da

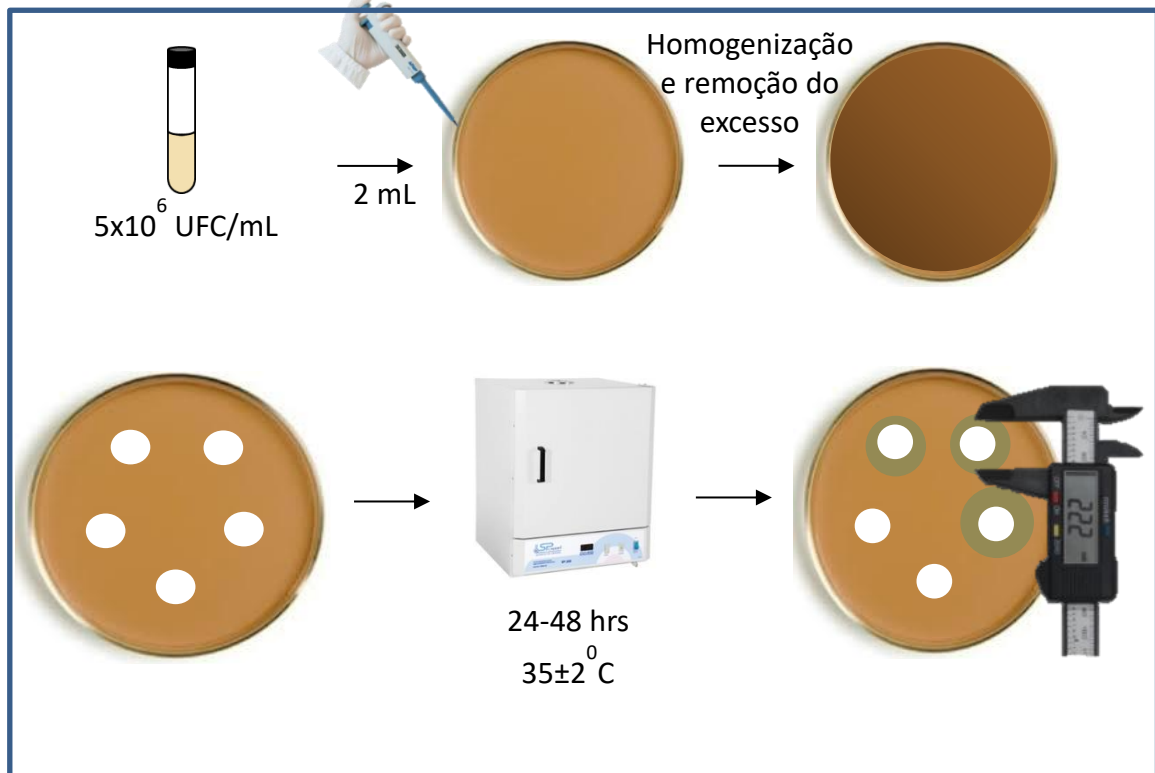
técnica de inundação da superfície do meio de cultura com uma suspensão fúngica nas diluições de 1:1 e 1:2, retirando-se o excesso do líquido com o auxílio de uma pipeta Pasteur (Figura 3). As placas foram mantidas entreabertas em estufa a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, durante 15 minutos para secagem.

Os discos estéreis de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com uma alíquota de 50 μL do HC de cada concentração a ser testada e, em seguida, foram colocados com pinça estéril sobre o meio CSD na placa de Petri, no qual foi previamente inoculado com o microrganismo testado, e pressionados levemente sobre a superfície do meio. Em cada placa foram colocados cinco discos obedecendo a distância de 20mm entre os discos e 15mm a partir da borda da placa. O controle positivo foi realizado com nistatina e o controle negativo com o hidrogel sem a incorporação do citral. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por um período de 24 a 48 horas.

A leitura foi efetivada, verificando-se a ocorrência da atividade antifúngica, através do aparecimento de halos de inibição em torno dos discos contendo o hidrogel.

Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados com um paquímetro digital, incluindo o diâmetro do disco. Os halos de inibição para os produtos testados foram interpretados nas categorias sensível, intermediário ou resistente, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M100-S18, 2008, M2-A9, 2006 (documento de disco difusão) (WEINSTEIN et al., 2020).

Figura 3: Ilustração esquemática do teste de suscetibilidade microbiana por disco-difusão em ágar, utilizando a técnica de inundação da superfície do meio de cultura.



Fonte: Próprio autor.

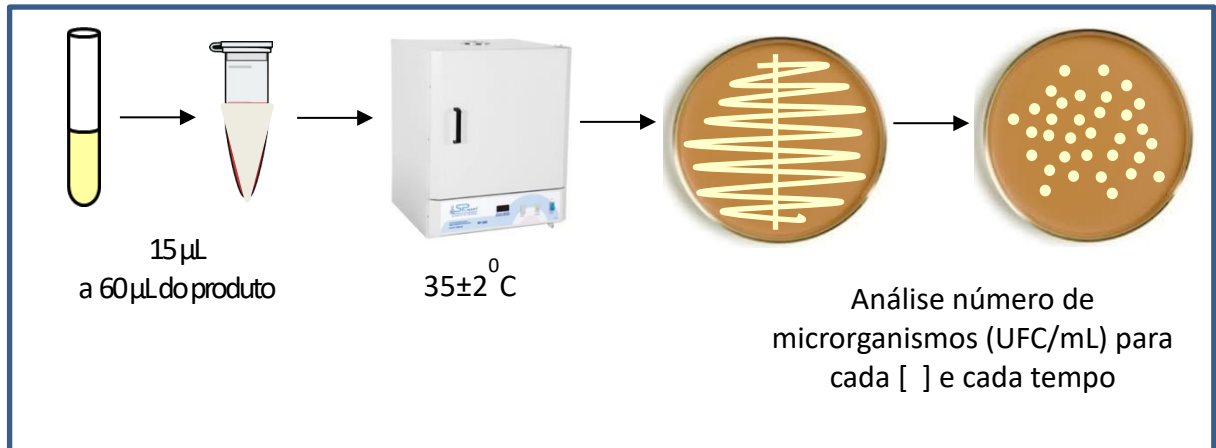
4.8.2.2 Cinética de crescimento microbiano sobre *C. albicans*

Foram realizados ensaios de crescimento dependentes da concentração de células de *C. albicans* e dependentes do tempo de exposição de acordo com metodologia de Sultan et al. (2019) com adaptações. Adicionou-se 15 μl de inóculo em diferentes concentrações (5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 e 5×10^6 UFC/mL) de *C. albicans* ATCC 10231 a 60 μl do produto teste em diferentes concentrações (CIM, CIMx2 e CIMx4) em tubos Eppendorf de 1 mL e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 120 min (Figura 4). Após a incubação nos intervalos de 15, 30 e 120 min, as alíquotas foram semeadas em ASD e incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para contagem de colônias viáveis (SULTAN et al., 2019).

Foram testados HC (62,5 $\mu\text{g/mL}$, 125 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$), nistatina (16 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$ e 64 $\mu\text{g/mL}$) e a base do hidrogel. O controle de crescimento foi realizado e o experimento feito em triplicata em dias alternados. Para análise do crescimento

microbiano dependente do tempo, os experimentos foram realizados conforme descrito utilizando 5×10^3 *C. albicans* ATCC 10231.

Figura 4: Ilustração esquemática da cinética de crescimento do microrganismo sob ação do produto testado.



Fonte: Próprio autor.

4.9 Análises de *in vivo* de Toxicidade oral aguda e de Potencial clastogênico e aneugênico

4.9.1 Toxicidade aguda *in vivo* do HC em camundongos

Para a realização desse teste foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos fêmeas, linhagem *Swiss*, idade seis semanas. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório, sob temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de claro e escuro controlado de 12h, todos provenientes do Centro Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba. Os mesmos foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais ao acaso e durante o experimento alojados em gaiolas (542 cm^2) do tipo microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar. Tais gaiolas apresentam forração com maravalhas de *Pinus*, esterilizada por radiação gama.

O grupo experimental foi tratado com HC, os animais receberam uma dose de 2000 mg/kg. No grupo controle foi utilizado o veículo (hidrogel sem incorporação do

citral) (OECD, 2001). Ambas substâncias administradas por via oral (Figura 5). Cada grupo foi composto por três animais (fêmeas), totalizando seis animais.

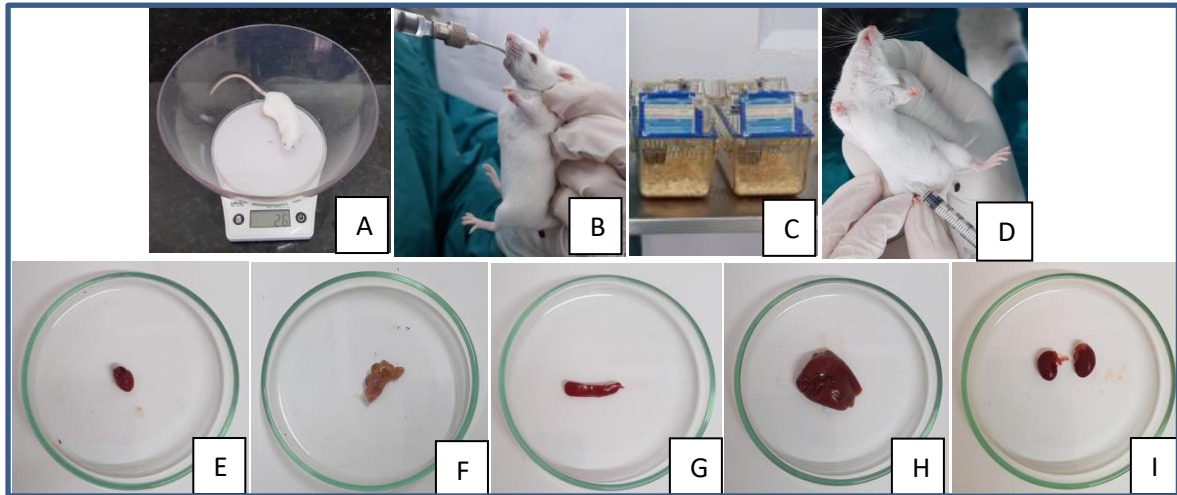
O ganho de peso dos animais pode ser afetado pela dificuldade na digestão e absorção de alimentos e nutrientes, uma indicação de possível efeito tóxico. A Organization of Economic Co-operation and Development (OECD) considera aceitável uma variação de até 20% do peso corporal. Além das variações comportamentais, a toxicidade de um composto pode ser avaliada por meio de mudanças no ganho de peso animal, redução no consumo de água e comida, e alterações na excreção de urina e fezes (OECD, 2001).

Sinais de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas foram observados, além disso, parâmetros como alteração da locomoção, aumento da frequência respiratória, diarreia, sialorréia, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos foram investigados. A observação se deu nas primeiras quatro horas após administração do hidrogel (sem ou com HC), nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos. Após findar a primeira hora, o acompanhamento ocorreu a cada 60 minutos até se completarem as quatro horas. Durante os 14 dias após administração do hidrogel (sem ou com HC), as observações foram diárias e sempre no mesmo horário do início do experimento (BRASIL, 2004).

O consumo de comida e água foi monitorado diariamente, e o peso corporal registrado no dia 0 (antes da dosagem) e dia 14. Após esse período, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso (30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de cetamina), por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada a excisão de material biológico (coração, estômago, fígado, baço e rins).

Os órgãos foram examinados macroscopicamente, a ressecção foi feita com consecutiva pesagem do coração, estômago, fígado, baço e rins. Os índices de órgãos foram calculados de acordo com a equação: $\text{índice} = \frac{\text{peso do componente (g)}}{\text{peso do animal (g)}} \times 100$. As secções de tecidos dos órgãos excisados, foram fixadas em solução de formaldeído a 10%, após 72 horas foi realizada a clivagem para processamento histopatológico para observação qualitativa de presença ou ausência de sinais de toxicidade como: hiperemia, presença de infiltrado inflamatório, binucleação, sinusóides dilatados e megalocitose (no fígado), mineralização da luz tubular (nos rins) (MAGALHÃES et al., 2018).

Figura 5: Ensaio de toxicidade oral aguda em camundongos *Mus Musculus*. Em A) Pesagem dos camundongos no início do experimento. B) Introdução do produto testado por gavagem. C) Acomodação dos camundongos em gaiolas de prolipopileno devidamente identificadas. D) Eutanásia dos camundongos por via intraperitoneal após 15 dias de observação e pesagem de ração e água. E) Órgãos excisados: coração. F) Estômago. G) Baço. H) Fígado. I) Rins.



Fonte: Próprio autor.

4.9.2 Investigação do potencial clastogênico e aneugênico em eritrócitos de camundongos

Para a realização desse teste foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem *Swiss*, idade sete semanas. Os animais foram aclimatados e alimentados nas mesmas condições acima citadas.

Foram utilizados três grupos experimentais, contendo cada grupo um total de três machos e três fêmeas, totalizando 18 animais (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013).

O grupo teste foi tratado a partir da administração por via oral de HC na dose de 2000 mg/kg. O grupo controle negativo recebeu tratamento apenas com hidrogel sem incorporação do citral e o grupo controle positivo recebeu administração do agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50 mg/Kg de peso do animal.

Vinte e quatro horas após a administração do HC os animais foram anestesiados intraperitonealmente (Xilazina 10 mg/kg e Cetamina 100 mg/kg) e uma amostra de sangue foi coletada por via intracardíaca (Figura 6). Em seguida, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso por via

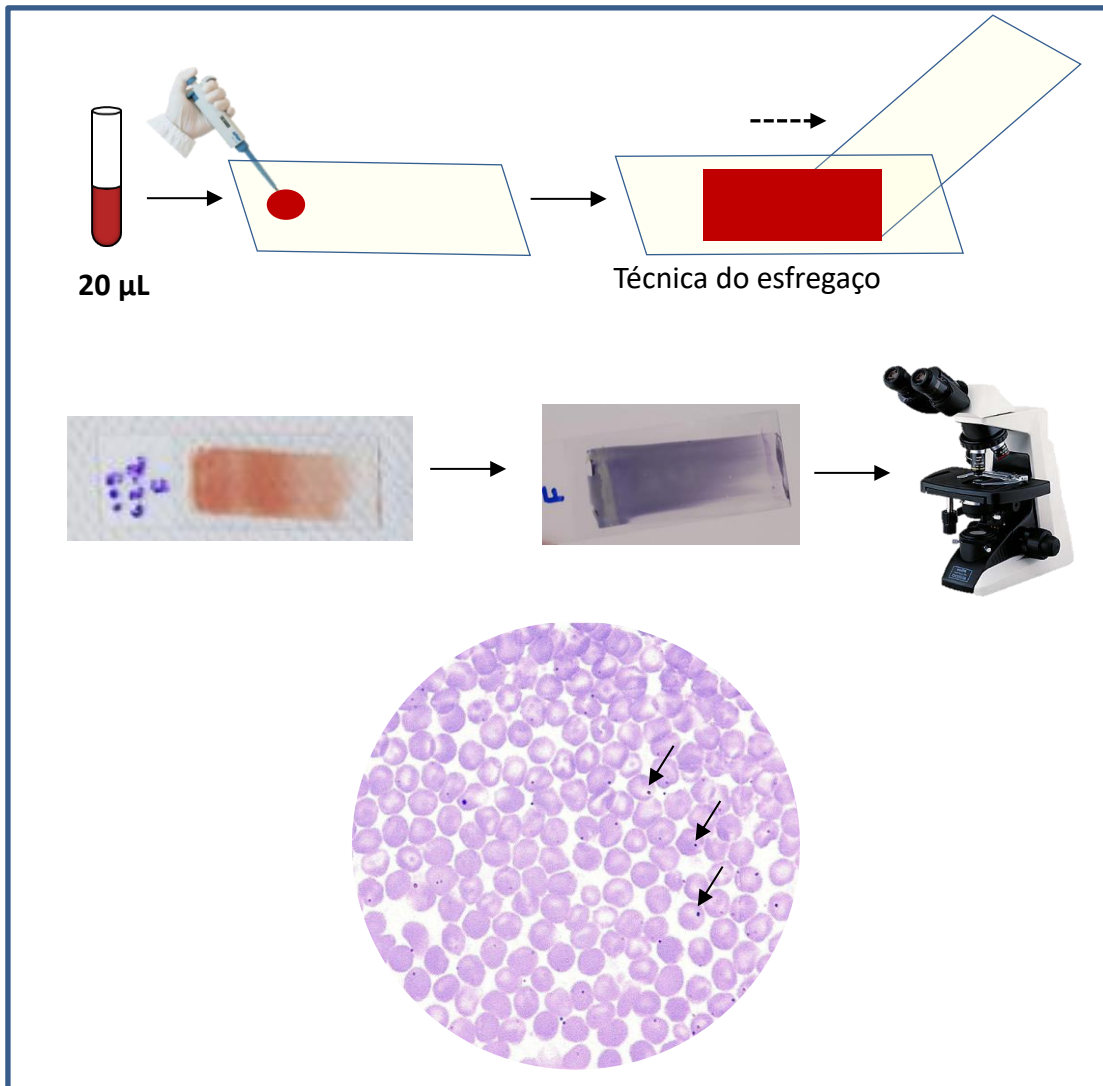
intracardíaca (30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de cetamina). As lâminas com amostras de sangue foram preparadas por esfregaço e coradas com ácido panótico para observação da presença ou ausência de micronúcleos em eritrócitos de cada animal em microscópio óptico no aumento de 1000x (Figura 7). Para análise quantitativa, considerou-se cinco campos por lâmina, num total de 2000 eritrócitos (HAYASHI et al., 2007). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão em comparação com o grupo controle positivo.

Figura 6: Teste de micronúcleo em camundongos *Mus Musculus*. Introdução do produto teste, anestesia por via intraperitoneal, coleta de material biológico por via intracardíaca seguida de eutanásia, respectivamente.



Fonte: Próprio autor.

Figura 7: Ilustração esquemática do processamento histológico das lâminas de sangue periférico de camundongos *Mus Musculus* e observação de micronúcleos em microscópio óptico de luz (aumento 100x).



Fonte: Próprio autor.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nos experimentos foram analisados através do software GraphPad Prism 5.0®, San Diego, CA, EUA. Os dados foram avaliados por estatística descritiva e inferencial. Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. As diferenças entre os grupos foram determinadas por análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Atividade antimicrobiana e efeitos do Citral em espécies causadoras de doenças bucais: revisão de literatura

Artigo submetido ao Boletim Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromáticas (BLACPMA)

Fator de impacto: 0.946

Atividade antimicrobiana e efeitos do Citral em espécies causadoras de doenças bucais: revisão de literatura

Julliana Cariry Palhano Freire^{1*}, Jozinete Vieira Pereira¹

¹Postgraduate Program in Dentistry, State University of Paraíba, Brazil

*Corresponding author: Julliana Cariry Palhano Freire, doctor student in Dentistry, State University of Paraíba. Street Baraúnas, 351 - Universitário, 58429-500, Campina Grande - Paraíba, Brazil. E-mail: jullianapalhano@hotmail.com

Resumo

Candidose bucal é uma infecção fúngica frequente em pacientes imunossuprimidos. Estudos demonstram atividade de compostos oriundos de óleos essenciais contra microrganismos envolvidos. Essa pesquisa realizou uma revisão de literatura sobre a ação antimicrobiana do citral em espécies de interesse para a Odontologia. Realizou-se uma busca nas seguintes bases de dados: Pubmed, Science direct, Scielo, Lilacs e Cochrane. Foram incluídos artigos dos últimos 15 anos que investigaram o efeito antimicrobiano e antifúngico do citral em espécies de interesse da Odontologia, assim como seu mecanismo de ação e toxicidade. Foram incluídos onze artigos científicos para a presente revisão. Dentre as espécies estudadas, o citral demonstrou ter atividade contra *Candida* spp e bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. Seu mecanismo de ação não foi determinado, e um dos estudos relatou baixa citotoxicidade. Conclui-se que o citral possui atividade antimicrobiana e antifúngica em espécies causadoras de doenças bucais.

Palavras-chave: Citral; Plantas medicinais; Odontologia.

Abstract

Oral thrush is a common fungal infection in immunosuppressed patients. Studies demonstrate the activity of compounds from essential oils against involved microorganisms. This research carried out a literature review on the antimicrobial action of citral in species of interest to Dentistry. A search was carried out in the

following databases: Pubmed, Science direct, Scielo, Lilacs and Cochrane. Articles from the last 15 years that investigated the antimicrobial and antifungal effect of citral in species of interest to Dentistry, as well as its mechanism of action and toxicity, were included. Eleven scientific articles were included for this review. Among the species studied, citral showed activity against *Candida* spp and bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. Its mechanism of action has not been determined, and one of the studies reported low cytotoxicity. It is concluded that citral has antimicrobial and antifungal activity in species that cause oral diseases.

Keywords: Citral; Plants, Medicinal; Dentistry.

Resumen

La candidiasis oral es una infección fúngica común en pacientes inmunodeprimidos. Los estudios demuestran la actividad de los compuestos de los aceites esenciales contra los microorganismos involucrados. En esta investigación se realizó una revisión de la literatura sobre la acción antimicrobiana del citral en especies de interés para la Odontología. Se realizó una búsqueda en las siguientes bases de datos: Pubmed, Science direct, Scielo, Lilacs y Cochrane. Se incluyeron artículos de los últimos 15 años que investigaron el efecto antimicrobiano y antifúngico del citral en especies de interés para la Odontología, así como su mecanismo de acción y toxicidad. Se incluyeron once artículos científicos para esta revisión. Entre las especies estudiadas, el citral mostró actividad contra *Candida* spp y bacterias como *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus* spp. No se ha determinado su mecanismo de acción y uno de los estudios informó de baja citotoxicidad. Se concluye que el citral tiene actividad antimicrobiana y antifúngica en especies que causan enfermedades bucales.

Palabras clave: Citral; Plantas medicinales; Odontología.

Introdução

Espécies de *Candida* estão presentes na microbiota bucal de forma comensal, porém quando há um desequilíbrio na microbiota bucal e principalmente em pacientes imunossuprimidos (CHOUHAN et al., 2019; KIRTI, 2019; POUR; SALARI; ALMANI, 2019), esses microrganismos podem desenvolver doenças orais como a candidose bucal. Essa doença tem alta prevalência e *C. albicans* é a espécie mais frequentemente associada ao seu aparecimento (FREIRE et al., 2017; LEWIS; WILLIAMS, 2017).

A candidemia é uma das infecções nosocomiais mais frequente a nível mundial e está associada à alta morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento. Essa doença é um grave problema de saúde pública, pois há uma crescente resistência dos fungos aos fármacos disponíveis no mercado e alta taxa de recidivas (KAUR; CHAKRABARTI, 2017; KHEDRI et al., 2018; TREVIÑO-RANGEL et al., 2018).

As células de levedura podem co-agregar com várias espécies bacterianas do biofilme dentário, afetando significativamente a saúde bucal e sistêmica. Biofilmes multiespécies aumentam expressivamente a resistência dos microrganismos comensais às terapias antimicrobianas convencionais e ao sistema imunológico do hospedeiro (LI et al., 2016; WANG et al., 2013). A resistência microbiana e a recorrência de lesões tem sido relacionadas ao uso de medicamentos convencionais no tratamento de doenças fúngicas e bacterianas (DIAS et al., 2018; LEWIS; WILLIAMS, 2017). A perda de equilíbrio entre as espécies que compõem o biofilme bucal é fundamental para prevenir o aparecimento e progressão de doenças bucais (CHAVES-QUIRÓS et al., 2020a)

Novas formas de tratamento complementar ou alternativo envolvendo plantas medicinais e seus fitoconstituintes com potencial antifúngico são investigadas (FREIRE et al., 2017; IOSIF et al., 2016; LIMA et al., 2012). Na Odontologia, produtos naturais obtidos a partir de plantas medicinais tem sido alvo de estudos quanto às suas propriedades farmacológicas e potencial antifúngico (ALMEIDA et al., 2018; LAVAEE et al., 2019; SILVA et al., 2019).

As ervas e os óleos essenciais derivados delas têm sido usados desde o início da história da humanidade para diversos fins devido à suas propriedades biológicas, como ação larvicida, propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, atividades antioxidantes, fungicidas e antitumorais (WIŃSKA et al., 2019).

O Citral é um composto ativo presente em diversos óleos essenciais utilizados pela população, como o *Cymbopogon citratus* (Capim-limão) e possui muitas propriedades biológicas e farmacológicas (GAO et al., 2020; LASKAR et al., 2020). Algumas de suas propriedades farmacológicas relatadas na literatura envolvem: atividade antitumoral (XIA et al., 2013), broncodilatadora (MANGPRAYOOL; KUPITTAYANANT; CHUDAPONGSE, 2013), antiprotozoária (CARDOSO; SOARES, 2010) e antimicrobiana (FREIRE et al., 2017; LEITE et al., 2014; LIMA et al., 2012; ZORE et al., 2011).

Tem sido demonstrado que esse composto apresenta potencial significativo para aplicações farmacêuticas no tratamento de infecções causadas por biofilmes multiespécies (GAO et al., 2020) e para incorporação a sistemas carreadores de compostos ativos baseados em nanoemulsões (LU et al., 2018). Assim, por demonstrar atividade antimicrobiana promissora contra colonizadores orais pode ser útil para prevenir o aparecimento e progressão de doenças bucais.

Porém seus efeitos ainda precisam ser elucidados, e o objetivo desse estudo foi investigar a ação antimicrobiana e o mecanismo de ação do citral em espécies de interesse para a Odontologia e avaliar sua toxicidade através de uma revisão de literatura.

Métodos

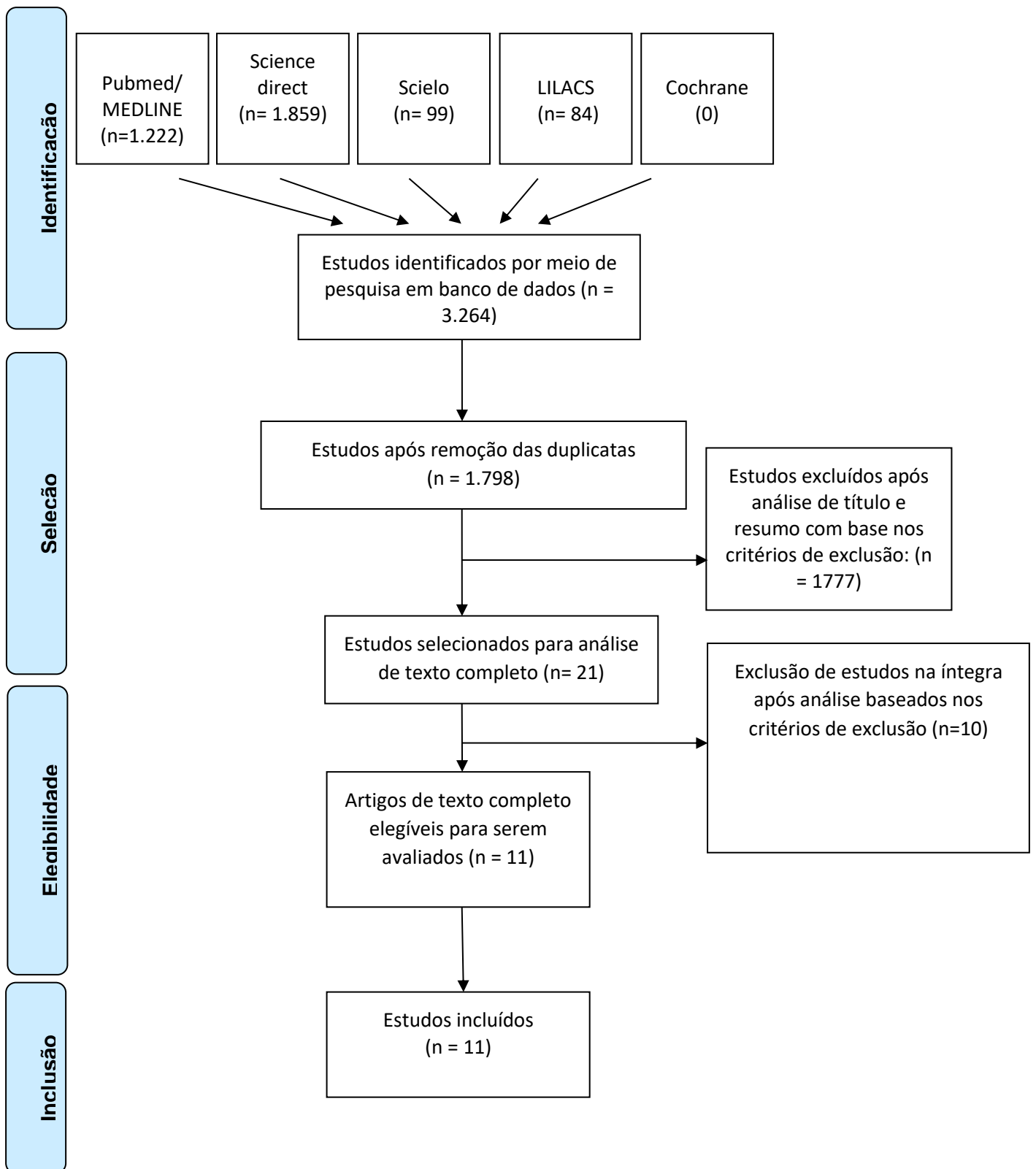
Realizou-se uma revisão integrativa de literatura para estudo da atividade antimicrobiana do citral, seu mecanismo de ação e efeitos toxicológicos.

Os critérios utilizados para seleção da amostra foram: artigos publicados nos bancos de dados da Literatura Internacional em Ciências da Saúde – Medline (Pubmed), Science Direct e Scielo. Os seguintes descritores foram utilizados: “Citral” OR “Citral AND Antimicrobial activity” OR “Citral AND Antifungal activity” OR “Citral AND toxicity” OR “Citral AND Dentistry”.

O período de publicação dos artigos durante a realização das buscas foi constituído pelos últimos 15 anos. Foram incluídas pesquisas que abordaram a ensaios com o citral frente aos microrganismos de interesse para a Odontologia e sua toxicidade. Não houve restrição de linguagem. Foram excluídas as teses e dissertações, assim como estudos que não abordaram o tema proposto (Figura 1).

Para elaboração desta revisão determinou-se: tema; objetivo; critérios de inclusão e exclusão dos artigos; definição das informações a serem observadas nos artigos selecionados; busca dos artigos. Foi realizada a leitura dos títulos e resumos dos estudos. Após análise e seleção de acordo com os critérios de inclusão e exclusão, fez-se a leitura dos textos na íntegra para avaliação dos resultados obtidos e elaboração da discussão e conclusão da presente revisão de literatura.

Figura 1: Fluxograma da revisão de literatura, incluindo as etapas de busca e seleção dos artigos e os resultados observados.



Resultados

Os resultados encontrados da busca da literatura estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Estudos selecionados para a revisão de literatura acerca da atividade antimicrobiana do citral para microrganismos de interesse em Odontologia, seu mecanismo de ação e toxicidade.

Autor/ano	Tipo de estudo	Objetivo	Método	Microorganismos	Resultados
(MIRANDA-CADENA et al., 2021)	<i>In vitro</i>	Atividade antifúngica e citotoxicidade de nanopartículas de citral	Teste de Suscetibilidade Antimicrobiana	Isolados clínicos de <i>C. albicans</i> , <i>C. auris</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. tropicalis</i> CIM 256 µg/mL	Nanopartículas com 256 µg/mL de citral apresentou as melhores características entre as formulações testadas.
(GAO et al., 2020)	<i>In vitro</i>	Avaliar a eficácia do citral contra biofilmes de <i>Staphylococcus aureus</i> e espécies de <i>Candida</i>	Microdiluição em caldo Microscopia de varredura a laser confocal MEV qRT-PCR	<i>C. albicans</i> <i>C. tropicalis</i> <i>S. aureus</i> CIM 0,0313%, 0,0156% e 0,0313%	Citral foi altamente eficaz para erradicar os biofilmes das espécies estudadas.
(CHAVES-QUIRÓS et al., 2020a)	<i>In vitro</i>	Atividade citotóxica em culturas de fibroblastos do ligamento periodontal humano e seu efeito antimicrobiano	Microdiluição em caldo Ensaio MTT	<i>E. faecalis</i> <i>S. mutans</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i> CIM 10.0 mg/mL	Citral possui efeito bacteriostático e bactericida, e baixa citotoxicidade
(CHATRATH et al., 2019)	<i>In vitro</i>	Atividade antibiofilme, mecanismo de ação	Microdiluição em caldo. Ligação com sorbitol e ergosterol. Ensaio de redução de sal de sódio MEV MCVL	<i>C. tropicalis</i> MIC ₅₀ =32 µg/mL	Atividade antifúngica moderada contra <i>C. tropicalis</i> . O citral tem como alvo a membrana celular.
(LU et al., 2018)	<i>In vitro</i>	Avaliar a atividade antimicrobiana de nanoemulsões de citral contra bactérias.	Disco-difusão	<i>Staphylococcus aureus</i> Ø 19,2 ± 2,3 <i>Escherichia coli</i> Ø 9,4 ± 0,5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Ø 6,2 ± 0,2 <i>Enterococcus faecalis</i> Ø 10,2 ± 0,6 <i>Salmonella typhimurium</i> Ø 2,0 ± 0,1 <i>Listeria monocytogenes</i> Ø 14,4 ± 2,6	As nanoemulsões de citral mostraram atividade antimicrobiana significativa contra <i>L. monocytogenes</i> e <i>S. aureus</i> .
(FREIRE et al., 2017)	<i>In vitro</i>	Atividade antifúngica	Microdiluição em caldo	<i>C. albicans</i> CIM 32 µg/mL CFM 64 µg/mL	Citral possui efeito fungicida em cepas de <i>C. albicans</i> .
(DE OLIVEIRA et al., 2017)	<i>In vitro</i>	Efeito do citral contra colonizadores dentários primários e espécies relacionadas à cárie	Microdiluição em caldo	<i>Actinomyces naeslundii</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , CIM 1.33 mg mL ⁻¹ CBM 2.75 mg mL ⁻¹ <i>S. gordonii</i> , <i>S. mitis</i> , <i>S. mutans</i> , CIM 2.75 mg mL ⁻¹ CBM 11.1 mg mL ⁻¹	Reduziu significativamente o número de células viáveis do biofilme de estreptococos.

				<i>S. sanguinis</i> <i>S. sobrinus</i>	
(LEITE et al., 2014)	<i>In vitro</i>	Atividade antifúngica Mecanismo de ação	Microdiluição em caldo ação do citral na parede celular (sorbitol 0,8 M), na membrana celular (ligação do citral ao ergosterol)	Isolados clínicos e duas cepas padrão de <i>C. albicans</i> CIM: 64 µg/mL e CFM: 256 µg/mL	Citral apresentou potencial antifúngico contra cepas de <i>C. albicans</i> . O mecanismo de ação do Citral não envolveu a parede celular ou a membrana celular das cepas de <i>C. albicans</i> testadas.
(LIMA et al., 2012b)	<i>In vitro</i>	Atividade antifúngica Mecanismo de ação	Microdiluição em caldo ação do citral na parede celular (sorbitol 0,8 M), na membrana celular (ligação do citral ao ergosterol)	Isolados clínicos de <i>C. albicans</i> CIM 256 a 512 e CFM 1024 µg/mL	Citral inibe o crescimento de <i>C. albicans</i> . O provável mecanismo de ação não envolveu a parede celular ou a membrana celular das cepas de <i>C. albicans</i> testadas.
(ZORE et al., 2011)	<i>In vitro</i>	Potencial anti- <i>Candida</i>	Microdiluição em caldo	<i>C. albicans</i> <i>C. parapsilosis</i> , <i>C. blankii</i> , <i>C. kefer</i> e <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>C. glabrata</i> e <i>C. tropicalis</i> CIM e CFM 0,032% (v/v)	Atividade fungicida e sinérgica ao uso do fluconazol.
(SILVA et al., 2008)	<i>In vitro</i>	Atividade antifúngica	Ensaio de difusão em disco para citral a 76% nas seguintes quantidades de óleo essencial: 2; 4 e 8 µL	<i>C. albicans</i> Ø 14.6/ 27.8/ > 40 <i>C. glabrata</i> , Ø 18.8/ 22.5/ > 30 <i>C. krusei</i> , Ø 12.3/ 14.3/ 19.7 <i>C. parapsilosis</i> Ø 9.0/ 18.1/ 27.5 <i>C. tropicalis</i> Ø 12.4/ 22.2/ 32.6 CIM=1.35, 2.70 e 5.41mg	Potente atividade <i>in vitro</i> contra <i>Candida</i> spp.

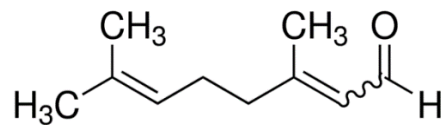
Fonte: Próprio autor.
Ø: diâmetro do halo de inibição.

Revisão de literatura

Os produtos vegetais e especialmente os óleos essenciais podem ser explorados como terapias alternativas. Óleos essenciais têm sido utilizados na etnomedicina como agentes antifúngicos contra infecções por *Candida*. São constituídos principalmente de terpenóides, amplamente distribuídos na natureza (MELLO et al., 1999). Estes constituintes são responsáveis pelas propriedades antissépticas, antibacterianas, antifúngicas e antiparasíticas (HOYLE et al., 2008). Os terpenos formam classes estruturais e funcionalmente diferentes. Esses compostos são formados pela combinação de várias unidades de 5-carbono-base (C5) chamado isopreno. Os principais terpenos são os monoterpenos (C10) e sesquiterpenos (C15) (BAKKALI et al., 2008).

Citral, de fórmula molecular $C_{10}H_{16}O$ (3,7-dimetil-2,6-octadienal) (Figura 2), é o nome dado a uma mistura natural de dois aldeídos de monoterpênos acíclicos isoméricos: geranial (*trans*-citral, citral A) e neral (*cis*-citral, citral B). É o constituinte básico do capim-limão (*Cymbopogon citratus*). Está presente em óleos de várias plantas como murta de limão (*Backhousia citriodora*), lúcia-lima (*Aloysia citrodora*), erva-cidreira (*Melissa officinalis*) e laranja (*Citrus sinensis*) (CHATRATH et al, 2019).

Figura 2: Fórmula estrutural do citral.



Silva et al. (2008) estudaram a atividade antifúngica do óleo de citronela e citral e constataram potencial *in vitro* contra espécies de *Candida*, incluindo *C. albicans*. Os autores verificaram halos de inibição de diâmetros de 9 a >40mm, a depender da quantidade utilizada do composto.

Zore et al. (2011) avaliaram o potencial anti-*Candida* de seis terpenoides (linalol, citral, eugenol, citronelol, benzoato de benzila e acetato de linalol), os quais demonstraram boa atividade contra *Candida* spp, sendo o linalol e citral os mais eficazes, inibindo todos os isolados de *C. albicans* e não *albicans* (*C. parapsilosis*, *C. blankii*, *C. kefer* e *C. pseudotropicalis*, *C. glabrata* e *C. tropicalis*). Nessa pesquisa, o citral apresentou atividade fungicida e sinérgica ao uso do fluconazol. Acredita-se que a atividade sinérgica seja devido a mudanças na fluidez da membrana, interferência com proteínas de sinalização ligadas a membrana e aumento do influxo de fluconazol. O citral interrompeu a fase S do ciclo celular da *C. albicans*.

Khan e Ahmad (2012) pesquisaram a atividade antibiofilme de quatro fitocompostos (cinamaldeído, citral, eugenol e geraniol) e sua sinergia com fluconazol e anfotericina B contra biofilmes pré-formados de *C. albicans*. Entre os resultados obtidos, o citral inibiu a formação de biofilmes, porém sendo menos eficaz que o cinamaldeído e geraniol.

Em um estudo sobre a atividade contra *C. albicans*, Lima et al. (2012) verificaram que o citral possui efeito fungistático e fungicida sobre essa levedura,

porém seu mecanismo de ação não foi determinado. Os autores realizaram testes sobre sorbitol e ergosterol e concluíram que o fitoconstituente não agiu sobre a parede e membrana celular fúngica.

Leite et al. (2014) analisaram a atividade antifúngica e o mecanismo de ação do citral frente cepas de *C.albicans*, concluindo que o envolvimento com a parede celular e a ligação ao ergosterol não são possíveis mecanismos de ação, e demonstraram seu potencial antifúngico contra as cepas de *C.albicans*. Os autores ressaltaram a necessidade de mais estudos sobre seus efeitos biológicos antes de ser utilizado como componente em novos medicamentos antifúngicos.

O estudo de Freire et al. (2017) revelou o efeito fungicida do citral em cepas de *C.albicans* isoladas de usuários de próteses dentárias removíveis, com o citral apresentando melhor CIM dentre os produtos fitoterápicos testados. Os autores destacaram a resistência das cepas clínicas à nistatina e verificaram que o composto agiu nas primeiras horas na cinética de crescimento de *C.albicans* (FREIRE et al., 2017).

Chatrath et al. (2019) estudaram a ação do citral e timol sobre *C. tropicalis* e seu biofilme. O estudo realizado verificou que o citral apresentou atividade antifúngica moderada contra *C. tropicalis*. Observou-se que citral como um agente antifúngico, atinge a membrana celular. Os autores recomendam que mais pesquisas sejam realizadas para verificar as diversas vias envolvidas na sobrevivência das células após o tratamento com diferentes agentes antifúngicos e assim buscar novas alternativas de terapias (CHATRATH et al., 2019).

Gao et al. (2020) verificaram que o citral foi altamente eficaz para erradicar o biofilme de duas espécies ao impedir as interações entre *C. albicans* e *S. aureus*, bem como quebrar as composições da matriz dos biofilmes. O tratamento com citral suprimiu as adesinas hifais e os fatores virulentos em *C. albicans*, bem como os genes envolvidos na biossíntese de ácidos graxos em *S. aureus*. Os autores ressaltam que embora baixa concentração de óleo essencial de capim-limão e citral tenham sido comprovados por possuírem baixa toxicidade para a pele humana, ainda é necessário realizar experimentos *in vivo* para testar os efeitos desses dois agentes em modelos animais (GAO et al., 2020).

Uma pesquisa formulou nanopartículas de citral e concluiu que na concentração de 256 µg/mL, o composto apresentou as melhores características dentre as formulações testadas (MIRANDA-CADENA et al., 2021). Outro estudo desenvolveu nanoemulsões de citral e verificou atividade antimicrobiana significativa contra *L. monocytogenes* e *S.aureus*. Sistemas carreadores de fármacos têm sido indicados na formulação de novos medicamentos à base de fitoterápicos por aumentar significativamente a atividade antimicrobiana do composto bioativo em comparação a sistemas não encapsulados. Esses sistemas podem aumentar a concentração dos compostos bioativos nas áreas onde os microorganismos estão localizados (LU et al., 2018).

Em uma revisão de literatura Ferreira et al. (2021) afirmaram que os estudos *in vitro* demonstram que os fitoquímicos, citral e timol foram os mais ativos. Outros estudos não clínicos e clínicos com esses compostos e óleos essenciais são necessários para determinar seu uso potencial e segurança para o tratamento da candidose oral (FERREIRA et al., 2021).

Discussão

O citral apresentou resultados satisfatórios quanto aos valores de CIM observados nas pesquisas. Os menores valores de CIM pertenceram às espécies de *Candida* (valores na faixa de 32 a 512 µg/mL) e os estudos que verificaram a atividade antifúngica do composto relacionaram seu efeito fungicida na espécie testada. Segundo o teste de difusão em ágar, foram encontrados halos de inibição do citral maior que 10 mm de diâmetro contra os microorganismos estudados. Dessa forma, sugere-se o potencial do citral como agente antifúngico.

Neste estudo foi constatado resultados contraditórios com relação ao mecanismo de ação do citral na célula fúngica. Enquanto Lima et al. (2012) e Leite et al. (2014) demonstram que esse composto não age na parede ou membrana celular, Catrath et al. (2019) afirmam que o mesmo agiu na membrana celular de *C. tropicalis*. Autores relatam que o citral atua como um agente fungicida porque é capaz de formar um complexo de transferência de carga com a célula fúngica, resultando em morte fúngica (SILVA et al., 2008).

Zhou et al. (2014) avaliaram a atividade antifúngica de três compostos voláteis: citral, octanal e α -terpineol contra *Geotrichum citri-aurantii*. A atividade antifúngica do citral foi atribuída à ação na membrana celular e consequente perda de componentes celulares (ZHOU; TAO; JIA, 2014).

Enquanto alguns pesquisadores sugerem que os óleos essenciais ou seus componentes não apresentam risco de produção de morte celular ou toxicidade (VASIREDDY; BINGLE; DAVIES, 2018), outros demonstraram que dependendo do tipo e da concentração, eles exibem efeitos citotóxicos nas células vivas, mas geralmente não são genotóxicos (BAKKALI et al., 2008). Os dados apresentados em uma pesquisa confirmam que embora o citral tenha efeitos citotóxicos mesmo em baixas concentrações, a magnitude da toxicidade aumentou com o aumento da concentração do composto (GAO et al., 2020). Postulou-se que tais efeitos são devidos a mecanismos pró-oxidantes a nível celular. Por ser lipofílico, esse composto pode atravessar a membrana citoplasmática, desestruturar suas diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios e torná-los mais permeáveis, de modo que a citotoxicidade parece incluir tais danos à membrana (BAKKALI et al., 2008).

As pesquisas na literatura sobre a atividade antifúngica do citral em espécies de *Candida* ainda são escassas. Seu mecanismo de ação precisa ser elucidado, assim como sua toxicidade. Além disso, não existem pesquisas *in vivo* que analisem sua eficácia em espécies causadoras de doenças bucais. Os estudos *in vitro* destacam o potencial do citral como agente antifúngico em espécies de *Candida*.

Conclusão

O Citral demonstrou possuir um efeito antimicrobiano em bactérias e em espécies de *Candida*. Verificou-se que sua ação antifúngica é relacionada à membrana celular fúngica e possui baixa citotoxicidade. Ressalta-se a importância de novos estudos para elucidar suas propriedades, como seu mecanismo de ação e toxicidade. Foi verificado o potencial promissor desse composto para o desenvolvimento de um medicamento aplicável às doenças bucais. Não foram encontradas pesquisas *in vivo* utilizando o citral com efeito contra microrganismos de interesse em Odontologia, constatando assim a escassez de estudos na literatura e a necessidade de aprofundamento nas metodologias com esse composto.

Referências

1. Chouhan S, Kallianpur S, Prabhu KT, Tijare M, Kasetty S, Gupta S. *Candida* prevalence in diabetics and its species identification. *Int J Appl basic Med Res*. 2019;9(1):49–54.
2. Pour AH, Salari S, Almani PGN. Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and HIVfree subjects in the Southeast of Iran. *Curr Med Mycol*. 2019;4(4):1–6.
3. Kirti YK. Prevalence of oral candidiasis in Indian HIV sero-positive patients with CD4+ Cell count correlation. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*. 2019;71(1):124–7.
4. Lewis MAO, Williams DW. Diagnosis and management of oral candidosis. *Br Dent J*. 2017;223(9):675–81.
5. Freire JCP, Júnior JK de O, Silva D de F, Sousa JP de, Guerra FQS, de Oliveira Lima E. Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated from users of dental prostheses. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2017;2017:1–9.
6. Khedri S, Santos ALS, Roudbary M, Hadighi R, Falahati M, Farahyar S, et al. Iranian HIV/AIDS patients with oropharyngeal candidiasis: identification, prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species. *Lett Appl Microbiol*. 2018;67(4):392–9.
7. Kaur H, Chakrabarti A. Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. *J fungi (Basel, Switzerland)*. 2017;3(3).
8. Treviño-Rangel R de J, Peña-López CD, Hernández-Rodríguez PA, Beltrán-Santiago D, González GM. Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: an observational nine-year single center study in Mexico. *Rev Iberoam Micol*. 2018;35(1):11–6.
9. Wang W-P, Yan X-L, Ni Y-F, Guo K, Ke C-K, Cheng Q-S, et al. Effects of lipid emulsions in parenteral nutrition of esophageal cancer surgical patients receiving enteral nutrition: a comparative analysis. *Nutrients*. 2013;6(1):111–23.
10. Li W, Gao J, Wei S, Wang D. Application values of clinical nursing pathway in patients with acute cerebral hemorrhage. *Exp Ther Med*. 2016;11(2):490–4.
11. Dias IJ, Trajano ERIS, Castro RD, Ferreira GLS, Medeiros HCM, Gomes DQC. Antifungal activity of linalool in cases of *candida* spp. isolated from individuals with oral candidiasis. *Brazilian J Biol*. 2018;78(2):368–74.
12. Chaves-Quirós C, Usuga-Usuga JS, Morales-Uchima SM, Tofiño-Rivera AP, Tobón-Arroyave SI, Martínez-Pabón MC. Assessment of cytotoxic and antimicrobial activities of two components of *Cymbopogon citratus* essential oil. *J Clin Exp Dent*. 2020;12(8):e749–54.
13. Iosif L, Preoteasa CT, Murariu-Măgureanu C, Preoteasa E. Clinical study on thermography, as modern investigation method for *Candida*-associated denture stomatitis. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(1):191–5.
14. Lima IO, de Medeiros Nóbrega F, de Oliveira WA, de Oliveira Lima E, Albuquerque Menezes E, Afrânio Cunha F, et al. Anti- *Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharm Biol*. 2012;50(12):1536–41.
15. Almeida CM de, Lima R de F, Costa TKVL da, Sousa IM de O, Cabral EC,

- Basting RT, et al. Antifungal, antibiofilm, and antiproliferative activities of *Guapira graciliflora* Mart. *Braz Oral Res.* 2018;32(0).
16. Silva DR, Rosalen PL, Freires IA, Sardi J de CO, Lima RF, Lazarini JG, et al. *Anadenanthera Colubrina* vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. *Braz Oral Res.* 2019;33(0):e023.
 17. Lavaee F, Motaghi D, Jassbi AR, Jafarian H, Ghasemi F, Badiee P. Antifungal effect of the bark and root extracts of *Punica granatum* on oral *Candida* strains isolated from liver recipients. *Curr Med Mycol.* 2019;4(4):20–4.
 18. Wińska K, Mączka W, Łyczko J, Grabarczyk M, Czubaszek A, Szumny A. Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative? [Internet]. Vol. 24, *Molecules.* MDPI AG; 2019.
 19. Laskar AA, Khan MA, Ahmad S, Hashmi A, Younus H. Citral inhibition of human salivary aldehyde dehydrogenase. *Cell Biochem Biophys.* 2020;78(1):31–42.
 20. Gao S, Liu G, Li J, Chen J, Li L, Li Z, et al. Antimicrobial activity of Lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and its active component citral against dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* species. *Front Cell Infect Microbiol.* 2020;10:603858.
 21. Xia H, Liang W, Song Q, Chen X, Chen X, Hong J. The *in vitro* study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. *Cytotechnology.* 2013;65(1):49–57.
 22. Mangprayool T, Kupittayanant S, Chudapongse N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. *Fitoterapia.* 2013;89:68–73.
 23. Cardoso J, Soares MJ. *In vitro* effects of citral on *trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2010;105(8):1026–32.
 24. Leite MCA, Bezerra AP de B, Sousa JP de, Guerra FQS, Lima E de O. Evaluation of Antifungal Activity and Mechanism of Action of citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complement Altern Med.* 2014;2014:1–9.
 25. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine.* 2011;18(13):1181–90.
 26. Lu WC, Huang DW, Wang CCR, Yeh CH, Tsai JC, Huang YT, et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *J Food Drug Anal.* 2018;26(1):82–9.
 27. Mello JCP de, Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G. *Farmacognosia da Planta ao Medicamento* [Internet]. 6th ed. 1999.
 28. Hoyle GE, Sharma V, MacLulich A, Seymour DG. Clinical aspects of delirium. *J R Coll Physicians Edinb.* 2008;38(2):154–7.
 29. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils - A review [Internet]. Vol. 46, *Food and Chemical Toxicology.* *Food Chem Toxicol*; 2008. p. 446–75.
 30. Chatrath A, Gangwar R, Kumari P, Prasad R. *In vitro* anti-biofilm activities of citral and thymol against *Candida tropicalis*. *J Fungi.* 2019;5(1):13.
 31. Khan MSA, 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; 50(1):33–42.
 32. Miranda-Cadena K, Dias M, Costa-Barbosa A, Collins T, Marcos-Arias C, Eraso E, et al. Development and characterization of monoolein-based liposomes of carvacrol, cinnamaldehyde, citral, or thymol with anti-*candida* activities. *Antimicrob Agents Chemother.* 2021;65(4).

33. Ferreira EDS, Rosalen PL, Benso B, De Cássia Orlandi Sardi J, Denny C, Alves De Sousa S, et al. The use of essential oils and their isolated compounds for the treatment of oral candidiasis: a literature review [Internet]. Vol. 2021, Evidence-based Complementary and Alternative Medicine. Hindawi Limited; 2021.
34. de Oliveira MAC, Borges AC, Brighenti FL, Salvador MJ, Gontijo AVL, Koga-Ito CY. *Cymbopogon citratus* essential oil: effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. *Braz Oral Res.* 2017;31.
35. Silva C de B da, Guterres SS, Weisheimer V, Schapoval EES. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Braz J Infect Dis.* 2008;12(1):63–6.
36. Tao N, OuYang Q, Jia L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. *Food Control.* 2014;41:116–21.
37. Zhou H, Tao N, Jia L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. *Food Control.* 2014;37:277–83.
38. Vasireddy L, Bingle LEH, Davies MS. Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the burkholderia cepacia complex. *PLoS One.* 2018;13(8).

6.2 Atividade antifúngica do citral em espécies de *Candida*: estudo *in silico* e *in vitro*

Artigo submetido a Archives of Oral Biology

Fator de impacto: 2.633

Atividade antifúngica do citral em espécies de *Candida*: estudo *in silico* e *in vitro*

Resumo

Este estudo avaliou, *in silico* a ação biológica e *in vitro* a atividade antifúngica do citral sobre *Candida* ssp, bem como a cinética de crescimento e seu mecanismo de ação. Foram utilizadas as cepas: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750 e cepas clínicas de *C. albicans* A4, *C. albicans* A5 e *C. albicans* A6. O ensaio *in silico* verificou o potencial biológico do citral em microrganismos de interesse para Odontologia, sua biodisponibilidade oral teórica e toxicidade oral aguda. Foi determinada a Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Fungicida Mínima (CFM) e seu efeito sobre a cinética de crescimento de *C. albicans*. Foram realizados o ensaio com sorbitol e ergosterol para análise do mecanismo de ação do citral. Os dados foram analisados por estatística descritiva e inferencial. Os ensaios *in silico* demonstraram que o citral apresenta amplo espectro de ação sobre microrganismos de importância clínica; possui boa biodisponibilidade oral teórica e baixa toxicidade oral aguda em ratos. A CIM do citral foi de 62,5 µg/mL para *C. albicans*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis*, e cepas clínicas de *C. albicans*, e 250 µg/mL para *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *C. albicans* associada à *C. glabrata*. O citral apresentou efeito significativo ($p < 0,05$) sobre a cinética de crescimento de *C. albicans*. O mecanismo de ação do citral envolveu a membrana plasmática através da interação com o ergosterol. Conclui-se que o citral apresenta potencial efeito antifúngico contra espécies de *Candida*, sendo um produto promissor para o tratamento de candidose oral.

Palavras-chave: Candidose oral. Citral. Fitoterapia.

Abstract

This study evaluated, *in silico* the biological action and *in vitro* the antifungal activity of citral on *Candida* ssp, as well as its growth kinetics and its mechanism of action. Strains were used: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 750 and clinical strains of *C. albicans*

A4, *C. albicans* A5 and *C. albicans* A6. The *in silico* test verified the biological potential of citral in microorganisms of interest to Dentistry, its theoretical oral bioavailability and acute oral toxicity. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC), Minimum Fungicidal Concentration (MFC) and its effect on the growth kinetics of *C. albicans* were determined. Sorbitol and ergosterol assays were performed to analyze the mechanism of action of citral. Data were analyzed using descriptive and inferential statistics. *In silico* assays showed that citral has a broad spectrum of action on clinically important microorganisms; it has good theoretical oral bioavailability and low acute oral toxicity in rats. The citral MIC was 62.5 µg/mL for *C. albicans*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis*, and clinical strains of *C. albicans*, and 250 µg/mL for *C. tropicalis*, *C. glabrata* and *C. albicans* associated with *C. glabrata*. Citral had a significant effect ($p < 0.05$) on the growth kinetics of *C. albicans*. The mechanism of action of citral involved the plasma membrane through interaction with ergosterol. It is concluded that citral has a potential antifungal effect against *Candida* species, being a promising product for the treatment of oral candidosis.

Keywords: Oral Candidiasis. Citral. Phytotherapy.

Introdução

Espécies de *Candida* vivem como comensais na cavidade bucal, e sob condições específicas, com o comprometimento da imunidade, podem se tornar patogênicas e ocasionar a candidose bucal (CHOUHAN et al., 2019; HOSAIN POUR et al., 2019; MIRANDA-CADENA et al., 2018a; QUINDOS et al., 2019a). As infecções causadas por biofilmes de *Candida* geralmente exibem alto grau de tolerância às terapias antifúngicas e, portanto, representam uma séria ameaça à saúde humana (GAO et al., 2020).

Além de *Candida albicans*, outras espécies são relacionadas a essas infecções como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei* (CHOUHAN et al., 2019; HOSAIN POUR et al., 2019; MIRANDA-CADENA et al., 2018a; QUINDOS et al., 2019a). A alta incidência de *Candida* não-*albicans* exige um controle mais efetivo da infecção, pois são espécies mais resistentes à terapia antifúngica e prolongam o processo de reparação da cavidade bucal (JAHANSHIRI et al, 2018; SANTOS et al, 2018).

A resistência de *Candida* aos antifúngicos é multifatorial, e diversos fatores devem ser considerados quando da escolha da terapêutica (DEORUKHKAR, 2015). Além disso, a limitação da eficácia e a restrição da dosagem de drogas sintéticas indicam a necessidade de encontrar novos insumos farmacêuticos ativos naturais

para o tratamento da candidose bucal (CHATRATH et al., 2019). Os medicamentos convencionais apresentam sérios problemas relacionados à resistência microbiana, toxicidade e farmacocinética inadequada (SCOTTI et al., 2012).

Por estas razões, novos fármacos e outras terapias são necessários para o tratamento de infecções causadas por *Candida* spp (FREIRE et al., 2017; IOSIF et al., 2016; LIMA et al., 2012). Na Odontologia, produtos naturais obtidos a partir de plantas medicinais tem sido alvo de estudos quanto às suas propriedades farmacológicas e potencial antifúngico. A fitoterapia se apresenta como terapia alternativa promissora devido a sua diversidade molecular, redução de efeitos adversos e baixa toxicidade (ALMEIDA et al, 2018; LAVAEE et al, 2019; SILVA et al, 2019). As ervas e os óleos essenciais derivados delas têm sido utilizados desde o início da história da humanidade para diversos fins. Plantas medicinais têm sido pesquisadas quanto às suas propriedades biológicas e utilizadas na medicina por seus efeitos benéficos como ação larvicida, propriedades analgésicas e antiinflamatórias, atividades antioxidantes, fungicidas, antitumorais e antimicrobianas (WIŃSKA et al., 2019).

Citral é o componente mais abundante do óleo essencial *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e é considerado seu constituinte biologicamente ativo (CHAVES-QUIRÓS et al., 2020b). Investigações anteriores verificaram que esse composto possui forte atividade contra um amplo espectro de espécies fúngicas e bacterianas (CHATRATH et al., 2019; CHAVES-QUIRÓS et al., 2020b; FREIRE et al., 2017; GAO et al., 2020).

Estudos recentes revelaram ação do citral contra espécies de *Candida albicans* (FREIRE et al., 2017; LEITE et al., 2014; LIMA et al., 2012b) e *C. tropicalis* (CHATRATH et al., 2019), além de efeito sobre biofilme duoespécie (GAO et al., 2020). Porém, resultados controversos têm sido demonstrados com relação ao seu mecanismo de ação nessas espécies. Assim, mais pesquisas são necessárias para elucidação das propriedades do citral. Desse modo, o presente estudo realizou uma análise *in silico* sobre as propriedades biológicas do citral, assim como uma avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do fitocomposto em espécies de *Candida*, a cinética de crescimento e seu mecanismo de ação em *C.albicans*.

Material e Métodos

O presente estudo se caracteriza por ser uma investigação experimental, *in silico* e *in vitro*.

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Análises e Diagnóstico (LAD) do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

Ensaio *in silico*

Para os ensaios *in silico* o desenho da molécula foi realizado no programa Chemdraw (<http://www.chemspider.com/>), o qual fornece as informações químicas referente a molécula estudada. A partir desses dados seguiu-se aos estudos *in silico* propostos nessa pesquisa.

A análise da probabilidade do desenvolvimento de propriedades farmacológicas do monoterpeno em estudo foi feita através do *PASS ONLINE*[®], software projetado como uma ferramenta para avaliar o potencial biológico geral de uma molécula semelhante a um fármaco orgânico. O *PASS* fornece previsões simultâneas de muitos tipos de atividade biológica com base na estrutura dos compostos orgânicos. O *programa* fornece características da ação biológica de um composto, obtendo os índices Pa (probabilidade "de ser ativo") e Pi (probabilidade "de ser inativo") estimando a categorização de um composto potencial em ser pertencente à subclasse de compostos ativos ou inativos, respectivamente (Srinivas et al., 2014).

Para avaliação dos parâmetros farmacológicos, foi analisado a biodisponibilidade oral teórica do produto, pela "Regra dos Cinco" de Lipinski, que estabelece que pelo menos três de quatro requisitos devam ser apresentados para que o composto possua uma boa biodisponibilidade. Assim, para que compostos sejam absorvidos, devem possuir miLogP menor ou igual a 5,00; MM menor ou igual a 500 g.mol^{-1} ; Área de superfície polar (TPSA) menor ou igual a 140 \AA^2 ou a soma do número de aceptores e doadores de ligação de hidrogênio menor que 12; Máximo de 10 grupos aceptores de ligação de hidrogênio (nALH), que é expresso pela soma de átomos de N e O; Máximo de 5 grupos doadores de ligação de hidrogênio (nDLH),

expresso pela soma de OH e NH na molécula (LIPINSKI et al., 2001). Para esta predição, foi empregado o programa Molinspiration Cheminformatics (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

Os parâmetros toxicológicos foram avaliados através da toxicidade oral aguda em ratos pelo programa GUSAR (General Unrestricted Structure–Activity Relationships) (<http://www.way2drug.com/gusar/acutoxpredict.html>). Esta ferramenta cria modelos QSAR/QSPR com base em semelhanças químicas entre compostos com efeitos tóxicos conhecidos e a presença de fragmentos tóxicos (Ghannay et al 2020). A toxicidade oral aguda foi classificada com base nas categorias da Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (*Organization for Economic Cooperation and Development*; OECD) que divide os compostos de acordo com seu valor de DL50 (conhecida como a dose letal mediana). A categoria I contém os compostos com valores de DL50 inferior ou igual a 5 mg/kg, a Categoria II contém compostos com valores de DL50 superiores a 5 mg/kg e inferior a 50 mg/kg, a Categoria III inclui compostos com valores de DL50 superiores a 50 mg/kg e inferior a 300 mg/kg, a Categoria IV consiste de compostos com valores de DL50 superiores a 300 mg/kg e inferior a 2000 mg/kg e a categoria V, valores de DL50 superiores a 2000 e inferior a 5000 mg/kg.

Ensaio de atividade antifúngica *in vitro*

Materiais empregados

O citral foi a substância requerida para o objeto de estudo dessa pesquisa. O medicamento licenciado utilizado para a execução dos testes foi a nistatina e fluconazol. Ambos adquiridos da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP). Para a realização dos ensaios farmacológicos, o citral foi solubilizado em Tween 80 a 2% e Dimetil-Sulfóxido (DMSO) em uma proporção de até 10%, completado com água destilada esterilizada (q.s.p. 5 mL) (CLEENLAND, SQUIRES, 1991).

Microrganismos utilizados e preparo do inóculo

Foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC

6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (22019), provenientes da Fundação Oswaldo Cruz/RJ e isolados clínicos: *Candida albicans* (A4, A5 e A6).

O preparo do inóculo para os testes de suscetibilidade foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008). As cepas de coleção de cultura e de isolados clínicos foram reativados a partir de sua cultura original em meio de cultura Ágar Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) e incubada a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$, por 24 h, em atmosfera de aerobiose. Após esse período, três a cinco colônias foram coletadas e suspensas em 10 mL de caldo Sabouraud Dextrose (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Após incubação a 37°C , por 24 h, o conjunto foi centrifugado e as células ressuspensas em 10 mL de solução salina estéril (NaCl 0,9%). Em seguida, o inóculo fúngico foi padronizado em espectrofotômetro (Modelo GT 7220 BioPet Technologies, Monte Alto, Brasil) com comprimento de onda de 530nm e absorvância entre 0,08–0,1, correspondendo à concentração de 5×10^6 UFC/mL. Nos poços da microplaca, durante os testes de atividade antimicrobiana, esta concentração resultou em $2,5 \times 10^3$ UFC/mL (CLSI, 2008).

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A atividade antifúngica do citral foi determinada segundo a normatização M27-A3 do *Clinical Laboratory and Standards Institute* (CLSI), por meio da técnica da microdiluição em caldo (CLSI, 2008). A partir desta, foram obtidas a CIM e a CFM do citral frente às cepas de coleção de cultura e de isolados clínicos.

Microplacas de fundo chato com 96 poços (Cralpast, Cotia, Brasil) foram preparadas inserindo-se 100 μL de meio de cultura (Caldo Sabouraud Dextrose) em todos os poços. Em seguida, 100 μL das diluições do citral (1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca. Diluições seriadas (1:2) foram então realizadas por meio da transferência de 100 μL aos poços subsequentes. Em seguida, 100 μL da suspensão dos microrganismos (diluído 1000 \times em caldo Sabouraud Dextrose) na concentração $2,5 \times 10^3$ UFC/mL foram inseridos em todos os poços. Desse modo, foram testadas as concentrações para o citral entre o intervalo de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 7,8 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de

inoculação de microrganismos nos poços), e do veículo (DMSO 5% e Tween 80 2%) foram realizados para garantir acurácia do método. Controle farmacológico como nistatina e fluconazol (controles positivos) foram realizados nas concentrações que variam de 64 a 0,5 µg/mL.

As placas foram incubadas a 35°C, por 24 h, em aerobiose. Após esse período, a CIM foi definida como a menor concentração da substância capaz de inibir o crescimento visível dos microrganismos avaliados. A viabilidade dos microrganismos foi determinada pela utilização do corante resazurina (3 mM), o qual foi pipetado (50 µL) em todos os poços após o período de incubação para determinação da CIM (24 h). A metabolização do corante pelos microrganismos viáveis resultou na produção de um pigmento de cor rosa.

A CFM foi determinada pela semeadura (10 µL) em placas de Ágar Sabouraud Dextrose, dos poços correspondentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM. Após semeadura, as placas foram incubadas a 35±2 °C por 24 h. A CFM foi considerada a menor concentração capaz de inibir o crescimento dos subcultivos. Essas análises foram realizadas em triplicata em dias independentes.

Efeito do citral sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans*

O efeito do citral sobre a cinética do crescimento foi determinado pela curva de *time-kill*, segundo metodologia proposta por Klepser et al. (1997) e de Castro et al. (2013) com modificações.

Foi utilizado nesse teste cepas de referência de *Candida albicans* (ATCC 10231) e clínica de *C.albicans* A6. O preparo do inóculo foi realizado seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 para leveduras (CLSI, 2008), conforme descrito previamente. Após a obtenção do inóculo, e diluições sucessivas, obteve-se suspensões dos microrganismos equivalentes a $2,5 \times 10^3$ UFC/mL.

Microplacas com 96 poços de fundo chato foram preparadas, inserindo-se 100 µL de meio de cultura Caldo Sabouraud Dextrose (Difco, Detroit, USA) em todos os poços. Em seguida, foram inseridos na primeira fileira de poços da microplaca, 100 µL do citral (1000 µg/mL), assim como para o controle farmacológico a Nistatina (256 µg/mL). Controle de viabilidade dos microrganismos (ausência de antimicrobiano), bem como controle de esterilidade do meio de cultura (ausência de inoculação de microrganismos nos poços) e controle do veículo (DMSO 5% e Tween 80 2%) também foram realizados e avaliados para garantir acurácia do método. Após a adição das

substâncias, foram realizadas diluições seriadas (1:2) por meio da transferência de 100 µL de alíquotas da primeira fileira de poços aos subsequentes. E em seguida, 100 µL da suspensão dos microrganismos diluído em Caldo Sabouraud Dextrose na concentração $2,5 \times 10^3$ UFC/mL foram inseridas em todos os poços. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 35 ± 2 °C, por 24 h, em aerobiose (CLSI, 2008).

Para esse teste, as concentrações avaliadas para o citral e nistatina corresponderam aquelas equivalentes a CIM, 2xCIM e 4xCIM µg/mL. Foi realizada a semeadura de alíquotas de 10 µL em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose nos intervalos de tempo de 0 (momento inicial), e 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12 e 24 horas após o início do ensaio. Após a coleta, as microplacas e placas de Petri foram incubadas em estufa a 35 ± 2 °C por um período de 24h. Decorrido esse período, o número de microrganismos viáveis (UFC/mL) foi avaliado para cada concentração e tempo de análise. Desse modo, por meio deste teste, determinou-se o efeito das substâncias analisadas, segundo a sua concentração e o tempo de ação exercido sobre *Candida albicans*.

Ação do citral sobre a parede celular fúngica - ensaio com sorbitol

A CIM do citral foi determinada na presença e ausência de sorbitol (protetor osmótico exógeno) pela técnica da microdiluição. Inicialmente, 100µL do meio de cultura caldo Saboraund Dextrose foram colocados em cada poço da placa. Subsequentemente, 100µL do citral foram transferidos para o primeiro poço e sequencialmente diluídos em razão de 2, obtendo concentrações entre 1000 e 0,48µL/mL. Finalmente, 100µL do inóculo ($2,5 \times 10^3$ UFC/mL) preparado com Caldo Sabouraud Dextrose previamente suplementado com sorbitol (concentração final de 0,8M) foram transferidos para cada poço. O crescimento fúngico, esterilidade do meio e veículo também foram controlados. A caspofungina foi utilizada como controle positivo. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C e feita a leitura entre o período de 48 horas e 7 dias após (FROST et al., 1995).

Ação do citral sobre a membrana celular fúngica - ensaio com ergosterol

Para determinar a interação do citral com o ergosterol, a CIM foi determinada sobre *C. albicans* pelo método da microdiluição na presença e ausência de ergosterol exógeno em concentrações de 100, 200 e 400µL/mL. A nistatina e anfotericina B

foram utilizadas como controle positivo. O veículo como controle negativo e a viabilidade do fungo na presença de ergosterol também foram observados. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas e após esse período foi realizada a leitura (ESCALANTE et al., 2008).

Resultados

A tecnologia computacional continua a aumentar em capacidade e aplicabilidade à previsão da toxicologia e a outras abordagens como o potencial biológico. Esta metodologia avançada é utilizada em vários estágios do desenvolvimento da substância por predição de propriedades que se correlacionam a modelos de estruturas existentes com a finalidade de desenvolvimento de novas formulações químicas pelo estudo de informações em bancos de dados químicos (PARTHASARATHI, DHAWAN, 2018).

Através do software PASS online foi definido os valores para o citral de ser ativo ou inativo em determinados alvos moleculares (tabela 1).

Constatou-se que esse composto apresenta possibilidade de obter ação contra vírus, fungos, bactérias, protozoários, além de ser antioxidante, como relatada na literatura. A maior probabilidade de ser ativo pertenceu à atividade antiviral contra Rhinovirus ($P_a=0,756$).

Tabela 1: Potencial biológico previsto para o citral em alvos moleculares.

Pa	Pi	Atividade
0,756	0,002	Antiviral (Rhinovirus)
0,693	0,027	Antineoplastic
0,370	0,009	Antineoplastic (carcinoma)
0,446	0,011	Antihelminthic
0,557	0,023	Antifungal
0,374	0,046	Antimycobacterial
		Tpr proteinase
0,466	0,032	(<i>Porphyromonas gingivalis</i>) inhibitor
0,478	0,060	Antiviral (Picornavirus)
0,474	0,065	Antiinflammator
0,432	0,023	Antituberculosic
		Cholesterol synthesis
0,416	0,009	inhibitor
0,380	0,012	Cholesterol oxidase inhibitor
		Sorbitol-6-phosphate 2-
0,422	0,020	dehydrogenase inhibitor
0,396	0,005	Antiviral (CMV)
0,385	0,013	Antioxidant
0,397	0,049	Antiprotozoal (Leishmania)
0,371	0,038	Antibacterial
0,320	0,067	Antipsoriatic
0,226	0,038	Antiprotozoal (Plasmodium)
0,209	0,035	Antineoplastic (renal cancer)
0,271	0,116	Antiviral (Adenovirus)
0,174	0,137	Antiprotozoal
0,112	0,111	Antiseptic
0,470	0,019	Antiparasitic

Pa – Probabilidade do composto ser ativo. Pi – Probabilidade de ser inativo.

As propriedades biológicas obtidas pelo Molinspiration estão descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Análise *in silico* do citral com o software Molinspiration.

Composto	miLogP	TPSA	PM	nALH	nDLH	nviolações	nrotb
Citral	3.65	17,07	152.24	1	0	0	4

miLogP – coeficiente de partição octanol/água;

PM – Peso molecular (g/mol^1);

nALH – número de grupos aceptores de ligação de hidrogênio;

nDLH – número de grupos doadores de ligação de hidrogênio;

nviolações – número de violações;

TPSA – área superficial polar topológica;

nrotb – número de bandas rotáveis.

Os resultados obtidos (Tabela 2) foram comparados com a Regra dos Cinco de Lipinski. O valor logP (logaritmo do coeficiente de partição entre n-octanol e log da água), é uma medida bem estabelecida da hidrofobia do composto. Foi demonstrado que compostos têm uma probabilidade razoável de serem bem absorvidos quando seu valor de logP $\leq 5,0$. Assim, através do valor obtido (miLogP=3.65), o composto em estudo se caracteriza por ter uma boa absorção.

O citral apresentou peso molecular na faixa aceitável (≤ 500) sugerindo sua absorção, transporte e difusão através da membrana. O parâmetro número de bandas rotáveis (nrotb) está relacionado à flexibilidade da molécula para a predição da biodisponibilidade, pois quanto maior a sua flexibilidade mais fácil a interação com o alvo molecular. Nesse estudo verificou-se que o monoterpene contém nrotb composto por 4 ligações simples (nrotb ≤ 10), o que contribui para a flexibilidade conformacional da molécula e, portanto, pode ser administrado por via oral.

O composto em estudo apresentou TPSA $<60\text{\AA}^2$, o que significa que será completamente absorvido. Após a comparação pode-se observar que o citral contemplou todos os parâmetros requeridos pela Regra dos Cinco de Lipinski, sendo assim, o produto apresenta uma boa biodisponibilidade oral teórica.

Os resultados obtidos por meio da análise de toxicidade aguda em ratos encontram-se na tabela 3. A previsão *in silico* dos valores de DL50 para ratos com quatro tipos de administração (oral, intravenosa, intraperitoneal, subcutânea, inalação) foi obtida. Por meio da análise do composto, observou-se que o citral foi classificado na categoria III de toxicidade aguda por via oral em ratos, com previsão de DL50 a 168.3 mg/kg.

Tabela 3: Previsão de toxicidade aguda do citral para roedores.

Composto	Rato IP LD50 (mg/kg)	Rato IV LD50 (mg/kg)	Rato Oral LD50 (mg/kg)	Rato SC LD50 (mg/kg)
Citral	168.3	168.3	168.3	168.3
	Classificação Rat IP LD50	Classificação Rat IV LD50	Classificação LD50 Oral de Rato	Classificação SC LD50 de rato
	Classe 4	Classe 4	Classe 3	Classe 4

IP - Via intraperitoneal de administração/ IV - Via intravenosa de administração/ Oral -Via oral de administração/ SC - Via subcutânea de administração

Atividade Antifúngica do citral sobre espécies de *Candida*

A atividade antifúngica do citral e dos fármacos padrão sobre *Candida* spp foi avaliada por meio de análise de Concentração Inibitória Mínima (CIM) capaz de exercer efeitos inibitórios e letais sobre o crescimento dos microrganismos. Os valores da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Fungicida Mínima (expressos em µg/mL), bem como a descrição da relação CFM/CIM estão descritas na tabela 4.

Tabela 4. Atividade antifúngica do citral e de fármacos padrão frente a *Candida* spp (valores de CIM e CFM expressos em µg/mL).

Leveduras	Citral			Nistatina			Fluconazol		
	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM	CIM	CFM	CFM/CIM
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	62,5	62,5	1	16	16	1	>64	>64	>1
<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	250	250	1	16	16	1	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231) + <i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	250	250	1	16	16	1	16	>64	>4
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	250	250	1	8	16	2	>64	>64	>1
<i>C. krusei</i> (ATCC 6258)	62,5	62,5	1	8	16	2	>64	>64	>1
<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	62,5	62,5	1	16	16	1	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (A4)	62,5	125	2	16	16	1	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (A5)	62,5	62,5	1	16	16	1	>64	>64	>1
<i>C. albicans</i> (A6)	62,5	62,5	1	16	16	1	>64	>64	>1

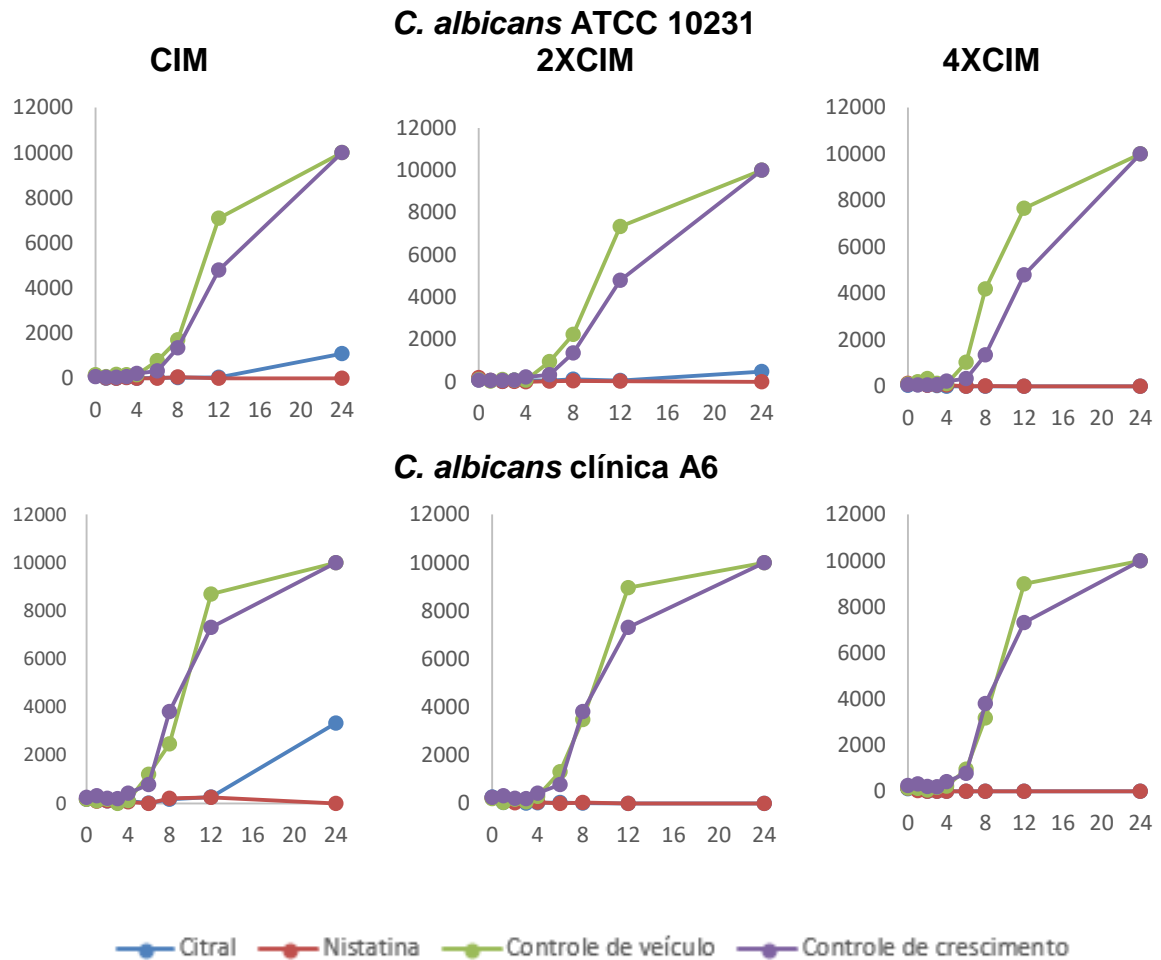
Fonte: Próprio autor.

De acordo com os resultados, pode-se observar que o citral apresenta atividade antimicrobiana frente a maioria das espécies de *Candida* testadas, apresentando o valor de CIM de 62,5 µg/mL para maioria das cepas de referência e clínicas avaliadas, com exceção de *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. albicans* (ATCC 10231) + *C. glabrata* (ATCC 90030) e *C. tropicalis* (ATCC 750), que apresentaram CIM 250 µg/mL, demonstrando menor sensibilidade à ação do citral. Evidenciou-se que, o citral demonstra ação fungicida sobre *Candida* spp avaliadas.

Ação do citral sobre a cinética do crescimento de *Candida albicans*

O efeito antifúngico do citral e da nistatina sobre o crescimento de células planctônicas de *C. albicans* (ATCC 10231) e cepa clínica (*C. albicans* A6) foi avaliado sob diferentes concentrações e tempos de ação das substâncias, visando a investigação dos seus efeitos sobre a cinética de crescimento desses microrganismos. Os resultados descritivos estão apresentados nas figuras 1 e 2.

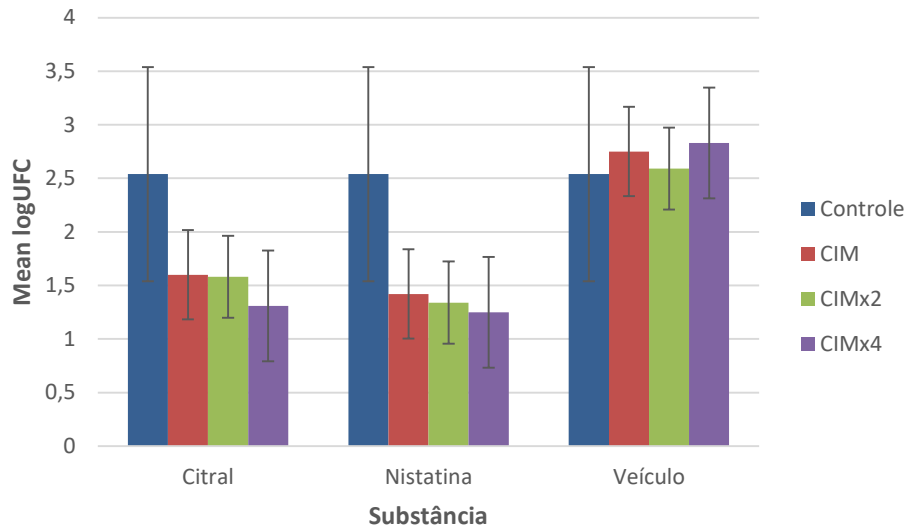
Figura 1. Efeito do Citral e da Nistatina na cinética de crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 e *C. albicans* A6 exposta às concentrações CIM, 2xCIM e 4xCIM. Resultados expressos através da média do número de microrganismos (eixo vertical-UFC/mL) segundo os diferentes tempos de ação (eixo horizontal).



Fonte: Próprio autor.

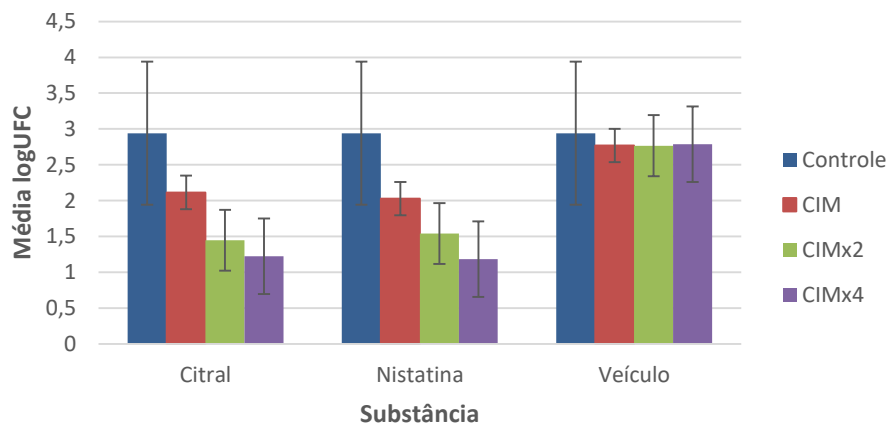
Com a finalidade de verificar a viabilidade dos microrganismos, comparando os grupos teste com o grupo controle de crescimento, todos os grupos passaram por transformação logarítmica (logUFC/mL), os dados estão expressos nas Figuras 2 e 3.

Figura 2: Efeito das substâncias sobre a cinética de crescimento de *C.albicans* (ATCC 10231) (valores expressos em LogUFC/mL).



Fonte: Próprio autor.

Figura 3: Efeito das substâncias sobre a cinética de crescimento de *C.albicans* A6 (valores expressos em Log UFC/mL).



Fonte: Próprio autor.

Foram realizados os testes estatísticos ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey. Houve diferença significativa ($p < 0,05$) no crescimento das cepas submetidas aos tratamentos com o citral e com a nistatina, entre suas referidas CIMs em comparação ao grupo controle (Tabela 5). Ou seja, o citral apresentou inibição estatisticamente significativa no crescimento de *C. albicans* em todas as CIMs testadas.

Tabela 5: Efeitos do citral e da nistatina sobre a cinética de crescimento de *Candida albicans* (Valores de média e desvio-padrão da viabilidade dos microrganismos).

<i>C.albicans</i> ATCC 10231				
Substância	Concentração	Média	Desvio-Padrão	Valor de p
Citral	Controle	2,5477 a	0,86198	-
	CIM	1,6 b	0,62743	0,01212
	2XCIM	1,5888 b	0,45725	0,02602
	4XCIM	1,3122 b	0,37349	0,00082
Nistatina	Controle	2,5477 a	0,86198	-
	CIM	1,4233 b	0,4	0,00027
	2XCIM	1,3433 b	0,41448	0,00099
	4XCIM	1,2577 b	0,38761	0,00331
Veículo	Controle	2,54777 a	0,86198	-
	CIM	2,75222 a	0,77900	0,9567
	2XCIM	2,59666 a	0,95642	0,9993
	4XCIM	2,83666 a	0,81086	0,8896
<i>C.albicans</i> A6				
Substância	Concentração	Média	Desvio-Padrão	Valor de p
Citral	Controle	2,94111 a	0,68590	-
	CIM	2,11333 b	0,69615	0,2771
	2XCIM	1,44777 b	0,51014	4,14E-05
	4XCIM	1,22333 b	0,43462	4,076E-06
Nistatina	Controle	2,94111 a	0,68590	-
	CIM	2,02777 b	0,27571	0,001936
	2XCIM	1,54111 b	0,48596	4,455E-06
	4XCIM	1,18444 b	0,39944	5,545E-08
Veículo	Controle	2,94111 a	0,68590	-
	CIM	2,76888 a	0,8371	0,9705
	2XCIM	2,76666 a	0,91804	0,9694
	4XCIM	2,78666 a	0,84236	0,9784

Fonte: Próprio autor.

*Letras diferentes indicam diferenças entre os grupos quando comparados ao controle de crescimento.

Ação do citral sobre a parede e membrana celular fúngica

O mecanismo de ação do citral foi observado através dos ensaios com sorbitol e ergosterol (Tabela 6). Pode-se observar que a CIM (62,5 µg/mL) do citral não foi alterada na presença do sorbitol, significando que o citral não interfere nas vias de biossíntese da parede celular. Enquanto na presença do ergosterol exógeno em diferentes concentrações, a CIM do citral aumentou para 250 µg/mL.

Tabela 6: Valores de CIM (µg/mL) na ausência e presença do sorbitol (0,8M) e ergosterol (100, 200 e 400 µg/mL) sobre cepas de *C.albicans* ATCC 10231.

Produto	Sorbitol		Ergosterol			
	Ausência	Presença	Ausência	100 µg/mL	200 µg/mL	400 µg/mL
Citral	62,5	62,5	62,5	250	250	250
Casposfungina	0,97	62,5	-	-	-	-
Nistatina	-	-	16	32	32	32
Anfotericina B	-	-	0,07	4,88	9,76	19,53

Fonte: Próprio autor.

Discussão

A análise farmacológica do citral utilizando o software *PASS ONLINE*® demonstrou que este composto tem a probabilidade de apresentar vários efeitos biológicos com importância terapêutica tais como: antiviral, antiprotozoário, antifúngico e antibacteriano.

Esses dados corroboram com pesquisas da literatura científica que demonstram ampla ação farmacológica desse composto em diferentes alvos: antitumoral (XIA et al., 2013), antiprotozoário (CARDOSO; SOARES, 2010; MORENO et al., 2018) e antimicrobiano (CHATRATH et al., 2019; FREIRE et al., 2017; LEITE et al., 2014; LIMA et al., 2012; ZORE et al., 2011). Outros autores confirmam que o citral é ativo contra o HSV-1 *in vitro* e tem ação anti-inflamatória, bloqueando a via do NF-κB (ADORJAN; BUCHBAUER, 2010).

Análises dos ensaios *in silico* predizem potente ação do citral na inibição da atividade enzimática e moderada na modulação do canal iônico. Assim, sugere-se a possibilidade do citral agir em alvos pertencentes à membrana celular. Esses

resultados direcionam o estudo do seu mecanismo de ação em espécies fúngicas, visto que a literatura se mostra contraditória na elucidação do modo de ação desse composto em espécies de *Candida*.

A biodisponibilidade oral do medicamento é a extensão fracionária da dosagem do medicamento que finalmente atinge o local de ação terapêutica. Em muitos casos, a maior parte da droga administrada por via oral é metabolizada e eliminada antes de atingir a circulação sanguínea sistêmica. Portanto, a baixa biodisponibilidade pode fazer com que um novo medicamento falhe em ensaios clínicos, mesmo que tenha alta eficácia em estudos anteriores *in vitro* e/ou *in vivo*. O uso de métodos computacionais como alternativa a esse cálculo de novos candidatos a fármacos, mesmo antes de sintetizar o composto, é vantajoso por economizar recursos e fornecer uma alternativa promissora aos protocolos experimentais tradicionais (KIM et al., 2014).

Após a comparação pode-se observar que o monoterpene em estudo não violou nenhuma das Regras dos Cinco de Lipinski, ou seja, o produto apresenta uma boa biodisponibilidade oral teórica. Corroborando com outras pesquisas que também apresentaram esse resultado com produtos naturais pesquisados (FERREIRA et al., 2021; OLIVEIRA et al., 2018).

Quanto à previsão da toxicidade aguda oral em ratos, o citral foi categorizado na classe III, assim como outros fitocompostos relatados em pesquisas (OLIVEIRA et al., 2018). Embora os produtos naturais sejam amplamente considerados de menor risco em comparação aos medicamentos sintéticos, eles não são completamente livres da possibilidade de toxicidade ou outros efeitos adversos (PA, 2004). Sendo assim, há a necessidade de realizar estudos toxicológicos para determinação de parâmetros de segurança que não são observados durante o uso popular dos derivados de plantas medicinais (LIMA-SARAIVA et al., 2016).

Neste estudo, constatou-se a atividade antifúngica do citral em cepas de *C. albicans* e cepas consideradas resistentes (*C. glabrata*, *C. Krusei*, *C. tropicallis* e *C. parapsilosis*). Os valores de CIM obtidos e o efeito fungicida aproximaram-se dos resultados encontrados na literatura (CHATRATH et al., 2019; FREIRE et al., 2017; LEITE et al., 2014; LIMA et al., 2012b), confirmando o potencial do composto contra

espécies de *Candida*. O citral apresentou potencial ação inibitória sobre o crescimento da maioria das espécies estudadas, e sobre as cepas clínicas analisadas.

A CIM do citral para *C. albicans* foi de 62,5 µg/mL e quando associada à *C. glabrata* foi observado uma maior resistência ao citral com aumento para 250 µg/mL. Esse fato está relacionado à resistência da espécie em associação. Mecanismos moleculares “defensivos” são desenvolvidos pelos fungos e estão relacionados ao perfil de resistência aos antifúngicos. São observadas alterações no alvo molecular do fármaco, super-expressão de bombas de efluxo, alterações na biossíntese do ergosterol, perda de porinas, “sobre expressão” da molécula alvo e produção de enzimas fúngicas que degradam o fármaco (BERMAN; KRYSAN, 2020; LEE et al., 2020; MBA; NWEZE, 2020; GHANNOUM; RICE, 1999; SANGLARD; ODDS, 2002).

Chatrath et al. (2019) investigaram a ação do citral em biofilmes maduros de *C. tropicalis* e também verificou o aumento da CIM de 32 µg/mL sobre cepas clínicas de *C. tropicalis* para 128 µg/mL sobre o biofilme maduro dessa mesma espécie. Os autores ressaltaram que a matriz extracelular do biofilme limita a penetração de agentes antimicrobianos (CHATRATH et al., 2019). Gao et al. (2020) apontaram o efeito do citral em biofilme duoespécie de *C. albicans* e *S. aureus*, e ressaltaram que a formação de biofilme polimicrobiano é atribuída a efeitos sinérgicos entre espécies que aumentam a resistência de microrganismos comensais contra agentes antimicrobianos.

De acordo com Siddiqui et al. (2010) a substância possui uma atividade fungistática quando a relação CFM/CIM ≥ 4 e fungicida quando CFM/CIM < 4 . Para Hafidh et al. (2011) sendo essa relação 1:1 e 2:1, o produto é considerado fungicida, e fungistático quando a razão é maior que 2:1. De acordo com essas metodologias, o citral demonstrou ter atividade fungicida para todas as espécies de *Candida* avaliadas.

Todas as cepas demonstraram resistência ao fluconazol (CIM > 64 µg/mL), corroborando com estudos recentes os quais observaram resistência de espécies de *Candida* a medicamentos convencionais, além de ser um agente fungistático (FREIRE et al., 2017; SOUSA et al., 2016). Antifúngicos amplamente utilizados em prática clínica tendem a apresentar resistência aos microrganismos. Devido à sua exposição frequente aos medicamentos antifúngicos, isolados de *Candida* e suas espécies desenvolvem resistência regularmente. Interações microbianas bucais favorece a

proliferação de microrganismos, facilitando o desenvolvimento de resistência microbiana (FREIRE et al., 2017; IOSIF et al., 2016; LIMA et al., 2012b).

Quanto à cinética de crescimento, a análise estatística revelou diferença significativa ($p < 0,05$) na inibição do crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 e cepa clínica A6 submetidas às diferentes CIMs do citral quando comparadas ao grupo controle. O mesmo foi observado para a nistatina, classificada também como agente fungicida e considerada padrão ouro no tratamento de candidose bucal. Tais dados destacam a atividade promissora do citral como agente antifúngico alternativo ao tratamento de infecções fúngicas causadas por *Candida* spp.

Esses resultados estão em consonância com pesquisas que relatam o efeito do citral na inibição dessa espécie nas primeiras horas de observação (FREIRE et al., 2017; LEITE et al., 2014). Tais dados revelaram a dependência da concentração com a atividade fungicida do citral. Leite et al. (2014) e Zore et al. (2011) também observaram o efeito fungicida do citral em *C. albicans* usando curva de crescimento microbiano. No primeiro estudo, o tempo necessário para a atividade fungicida do citral foi de 4 h na CIM (64 $\mu\text{g/mL}$) e 2 h na CIMx2 (128 $\mu\text{g/mL}$). No último estudo, 640 $\mu\text{g/mL}$ de citral inibiu 99,9% do inóculo em 2 h (LEITE et al., 2014; ZORE et al., 2011).

Na investigação da possível ação do citral na parede celular, foi realizado o teste com sorbitol. O composto que age na parede celular fúngica se liga à esse protetor osmótico exógeno, e então uma maior concentração do fármaco é necessária para que haja a inibição do crescimento da célula fúngica (FROST et al., 1995). Dessa forma, o mecanismo de ação do citral em cepas de *C. albicans* não envolveu a parede celular fúngica, pois sua CIM permaneceu inalterada na presença e ausência do sorbitol exógeno. Tais achados condizem com pesquisas realizadas com o citral (CHATRATH et al., 2019; LEITE et al., 2014; LIMA et al., 2012b). A caspofungina exibiu um aumento de sua CIM de 0,97 $\mu\text{g/mL}$ para 62,5 $\mu\text{g/mL}$ na presença do sorbitol exógeno. A caspofungina é um lipopeptídeo que inibe a glucano sintase, responsável pela biossíntese de β -1,3-D-glucano, um importante componente estrutural da parede celular fúngica (Montagna et al., 2015). A presença do sorbitol exógeno exigiu uma maior CIM do fármaco para que houvesse a inibição do crescimento fúngico.

No estudo da interação do citral com o ergosterol, foi utilizado o ergosterol exógeno. Sendo assim, se a atividade do citral for promovida através da ligação ao

ergosterol, o ergosterol exógeno adicionado ao meio de cultura impedirá a ligação ao ergosterol na membrana fúngica. Isso ocasionará um aumento da CIM para o citral na presença do ergosterol exógeno, pois apenas uma concentração superior do produto no meio, garantiria a interação com o ergosterol da membrana fúngica (ESCALANTE et al., 2008).

Neste estudo, foi observado aumento da CIM do citral na presença de ergosterol exógeno para a cepa testada em relação aos controles (Tabela 5). Como controle positivo, foi utilizada a nistatina e a anfotericina B, que atuam a nível da membrana celular fúngica e foi observado um aumento de suas CIMs de 16 µg/mL para 32 µg/mL e de 0,07 µg/mL a 19,53 µg/mL, respectivamente. O mecanismo de ação da nistatina e da anfotericina B consiste na ligação aos esteróides existentes na membrana celular dos fungos susceptíveis, com resultante alteração na permeabilidade da membrana celular e consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático (Touil et al., 2020). O citral ao se ligar ao ergosterol exógeno presente no meio, exibiu um aumento de sua CIM de 62,5 µg/mL para 250 µg/mL, sugerindo que esse composto atua na membrana celular fúngica para inibir o crescimento fúngico.

Chatrath et al. (2019) observaram que o citral, como agente antifúngico, tem como alvo a membrana celular, por afetar os níveis de expressão de genes biossintéticos de ergosterol (*ERG11/CYT450* e *CNB1*). Qiuli OuYang et al. (2016) investigaram o mecanismo de ação do citral em *Penicillium digitatum* e detectaram que a exposição ao citral inibiu os níveis de expressão de cinco genes biossintéticos de ergosterol (por exemplo, *ERG7*, *ERG11*, *ERG6*, *ERG3* e *ERG5*) (QIULI; NEGGUN; GUOXING, 2016). Wang et al. (2019) também verificaram que o citral prejudicou a integridade celular de *Alternaria alternata* através do distúrbio da expressão gênica, o que foi ainda confirmado pelo fato de que a exposição ao citral causou a interrupção irreversível dos esporos dos fungos e a inibição da biossíntese do ergosterol (LIUQING et al., 2019).

Segundo Harris (2002), o citral atua predominantemente na membrana celular do fungo, afetando sua estrutura, bloqueando a síntese de ergosterol e causando morte celular (HARRIS, 2002). A literatura sugere que a atividade antifúngica do citral é devida à sua capacidade de formar um complexo de transferência de carga com a célula fúngica, resultando na morte dos fungos (KURITA et al., 2014). Os resultados

obtidos por Rajput e Karuppayil demonstram que o citral alterou o valor de sua CIM na presença do ergosterol (RAJPUT; KARUPPAYIL, 2013). Leite et al. (2015) e Lima et al. (2012) contradizem esses resultados ao observar que a CIM do citral não foi alterada na presença de ergosterol. Os autores sugerem diferenças metodológicas para tais resultados.

Devido ao aumento de infecções fúngicas e a alta prevalência de candidose bucal, a busca por novas alternativas de tratamentos é necessária. Os resultados desse estudo revelaram que o citral é um composto com potencial ação antifúngica e promissor para o desenvolvimento de medicamento contra espécies de *Candida*.

Considerações finais

- Os ensaios *in silico* demonstraram que o citral possui boa biodisponibilidade oral teórica e baixa toxicidade oral aguda em ratos;
- O citral apresentou potencial atividade antifúngica contra cepas padrão de *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. albicans* em associação com *C. glabrata* e isolados clínicos de *C. albicans*;
- A atividade antifúngica do citral se classificou como fungicida, considerando a relação CFM/CIM para todas as espécies fúngicas estudadas;
- O citral interferiu na cinética de crescimento da cepa padrão e clínica de *C. albicans*, inibindo seu crescimento em todas as CIMs testadas;
- O provável mecanismo de ação do citral não envolveu a parede celular fúngica de *C. albicans*;
- O citral apresentou ação sobre a membrana celular de *C. albicans* através de sua interação com o ergosterol presente nesta membrana.

Referências

Adorjan, B., Buchabauer, G. (2010). Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(6), 407–426.

Almeida, C. M., Lima, R. F., Costa, T., Sousa, I., Cabral, E. C., Basting, R. T., Torre, A. D., Cavalcanti, Y. W., Rosalen, P. L., Duarte, M., Ruiz, A., Foglio, M. A., Godoy,

G. P., & Costa, E. (2018). Antifungal, antibiofilm, and antiproliferative activities of *Guapira graciliflora* Mart. *Brazilian oral research*, 32, e41. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2018.vol32.0041>

Arendrup, M. C., & Patterson, T. F. (2017). Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *The Journal of infectious diseases*, 216(suppl_3), S445–S451. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix131>

Berman, J., & Krysan, D. J. (2020). Drug resistance and tolerance in fungi. *Nature reviews. Microbiology*, 18(6), 319–331. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0322-2>

Cardoso, J.; Soares, M. J. (2010) *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8), 1026–32.

Chatrath, A., Gangwar, R., Kumari, P., & Prasad, R. (2019). In Vitro Anti-biofilm activities of citral and thymol against *Candida tropicalis*. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 5(1), 13. <https://doi.org/10.3390/jof5010013>

Chaves-Quirós, C., Usuga-Usuga, J. S., Morales-Uchima, S. M., Tofiño-Rivera, A. P., Tobón-Arroyave, S. I., & Martínez-Pabón, M. C. (2020). Assessment of cytotoxic and antimicrobial activities of two components of *Cymbopogon citratus* essential oil. *Journal of clinical and experimental dentistry*, 12(8), e749–e754. <https://doi.org/10.4317/jced.56863>

Chouhan, S., Kallianpur, S., Prabhu, K. T., Tijare, M., Kasetty, S., & Gupta, S. (2019). Candidal prevalence in diabetics and its species identification. *International journal of applied & basic medical research*, 9(1), 49–54. https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_259_18

Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian VMD. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. Willians & Wilkins; 1991: 739-788.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS ed. Pennsylvania: [s.n.].

Escalante, A., Gattuso, M., Pérez, P., & Zacchino, S. (2008). Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *Journal of natural products*, 71(10), 1720–1725. <https://doi.org/10.1021/np070660i>

Ferreira, E., Rosalen, P. L., Benso, B., de Cássia Orlandi Sardi, J., Denny, C., Alves de Sousa, S., Queiroga Sarmiento Guerra, F., de Oliveira Lima, E., Almeida Freires, I., & Dias de Castro, R. (2021). The use of essential oils and their isolated compounds for the treatment of oral candidiasis: a literature review. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2021, 1059274. <https://doi.org/10.1155/2021/1059274>

Freire, J., Júnior, J., Silva, D. F., de Sousa, J. P., Guerra, F., & de Oliveira Lima, E. (2017). Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated from users of dental prostheses. *Evidence-based complementary and alternative*

medicine: eCAM, 2017, 7158756. <https://doi.org/10.1155/2017/7158756>

Frost, D. J., Brandt, K. D., Cugier, D., & Goldman, R. (1995). A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *The Journal of antibiotics*, 48(4), 306–310. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.48.306>

Gao, S., Liu, G., Li, J., Chen, J., Li, L., Li, Z., Zhang, X., Zhang, S., Thorne, R. F., & Zhang, S. (2020). Antimicrobial activity of lemongrass essential oil (*Cymbopogon flexuosus*) and its active component citral against dual-species biofilms of *staphylococcus aureus* and *Candida* species. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 603858. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.603858>

Ghannay, S., Bakari, S., Msaddek, M., Vidal, S., Kadri, A., Aouadi, K. (2020). Design, synthesis, molecular properties and *in vitro* antioxidant and antibacterial potential of novel enantiopure isoxazolidine derivatives. *Arabian Journal of Chemistry*, 13(1), 2121-2131.

Ghannoum, M. A., & Rice, L. B. (1999). Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 501–517. <https://doi.org/10.1128/CMR.12.4.501>

Hafidh, R. R., Abdulmir, A. S., Vern, L. S., Abu Bakar, F., Abas, F., Jahanshiri, F., & Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The open microbiology journal*, 5, 96–106. <https://doi.org/10.2174/1874285801105010096>

Harris, R. (2002). Progress with superficial mycoses using essential oils. *International Journal of Aromatherapy*, 12(2), 83–91, 1.

Hoyle, G. E., Sharma, V., MacLulich, A., & Seymour, D. G. (2008). Clinical aspects of delirium. *Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh*, 38(2), 154-157.

Hosain Pour, A., Salari, S., & Ghasemi Nejad Almani, P. (2018). Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and non-HIV subjects in the Southeast of Iran. *Current medical mycology*, 4(4), 1–6. <https://doi.org/10.18502/cmm.4.4.379>

Iosif, L., Preoteasa, C. T., Murariu-Măgureanu, C., & Preoteasa, E. (2016). Clinical study on thermography, as modern investigation method for *Candida*-associated denture stomatitis. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*, 57(1), 191–195.

Jahanshiri, Z., Manifar, S., Moosa, H., Asghari-Paskiabi, F., Mahmoodzadeh, H., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2018). Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. *Journal de mycologie medicale*, 28(2), 361–366. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.01.001>

- Kaur, H., & Chakrabarti, A. (2017). Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 3(3), 41. <https://doi.org/10.3390/jof3030041>
- Klepser, M. E., Ernst, E. J., Lewis, R. E., Ernst, M. E., & Pfaller, M. A. (1998). Influence of test conditions on antifungal time-kill curve results: proposal for standardized methods. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 42(5), 1207–1212. <https://doi.org/10.1128/AAC.42.5.1207>
- Kim, M. T., Sedykh, A., Chakravarti, S. K., Saiakhov, R. D., & Zhu, H. (2014). Critical evaluation of human oral bioavailability for pharmaceutical drugs by using various cheminformatics approaches. *Pharmaceutical research*, 31(4), 1002–1014. <https://doi.org/10.1007/s11095-013-1222-1>
- Kurita, N. et al. (2014). Antifungal Activity of Components of Essential Oils. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45(4), 945–952. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1981.10864635>
- Lavaee, F., Motaghi, D., Jassbi, A. R., Jafarian, H., Ghasemi, F., & Badiee, P. (2018). Antifungal effect of the bark and root extracts of *Punica granatum* on oral *Candida* isolates. *Current medical mycology*, 4(4), 20–24. <https://doi.org/10.18502/cmm.4.4.382>
- Lee, Y., Puumala, E., Robbins, N., & Cowen, L. E. (2021). Antifungal drug resistance: Molecular mechanisms in *Candida albicans* and beyond. *Chemical reviews*, 121(6), 3390–3411. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00199>
- Leite, M. C., Bezerra, A. P., de Sousa, J. P., Guerra, F. Q., & Lima, E. (2014). Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2014, 378280. <https://doi.org/10.1155/2014/378280>
- Lima-Saraiva, S.R.G. DE et al. (2016). Antioxidant activity and acute toxicity of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). *African Journal of Biotechnology*, 11(75), 13998–14006, 26.
- Lima, I. O., de Medeiros Nóbrega, F., de Oliveira, W. A., de Oliveira Lima, E., Albuquerque Menezes, E., Cunha, F. A., & Formiga Melo Diniz, M. (2012). Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharmaceutical biology*, 50(12), 1536–1541. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.694893>
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., & Feeney, P. J. (2001). Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 46(1-3), 3–26. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(00\)00129-0](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(00)00129-0)
- Mba, I. E., & Nweze, E. I. (2020). Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology*, 39(10), 1797–1819. <https://doi.org/10.1007/s10096-020-03912-w>

Miranda-Cadena, K., Marcos-Arias, C., Mateo, E., Aguirre, J. M., Quindós, G., & Eraso, E. (2018). Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. *Archives of oral biology*, *95*, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.017>

Montagna, M. T., Lovero, G., Coretti, C., Martinelli, D., De Giglio, O., Iatta, R., Balbino, S., Rosato, A., & Caggiano, G. (2015). Susceptibility to echinocandins of *Candida* spp. strains isolated in Italy assessed by European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing and Clinical Laboratory Standards Institute broth microdilution methods. *BMC microbiology*, *15*, 106. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0442-4>

Moreno, É. M., Leal, S. M., Stashenko, E. E., & García, L. T. (2018). Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). *BMC complementary and alternative medicine*, *18*(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2293-7>

OECD. Guideline 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method.Publications - OECD. Disponível em: <<https://www.oecd.org/publications/>>. Acesso em: 20 jun. 2021.

Oliveira, V., et al. (2018). Análise farmacológica e toxicológica in silico do flavonóide 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona pharmacological and toxicological analysis in silico of flavonoide 5-Hydroxy-4', 7-Dimetoxiflavone. *Journal of Medicine and Health Promotion*, *3*(1), 913–921.

OuYang, Q., Tao, N., & Jing, G. (2016). Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. *BMC genomics*, *17*(1), 599. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2943-4>

Parthasarathi, Dhawan, 2018. *In silico* approaches for predictive toxicology. *In Vitro Toxicology* (pp.91-109).

Quindós, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar, N., & Eraso, E. (2019). Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, *24*(2), e172–e180. <https://doi.org/10.4317/medoral.22978>

Rajput, S. B., & Karuppayil, S. M. (2013). Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *SpringerPlus*, *2*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-2-26>

Sanglard, D., & Odds, F. C. (2002). Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. *The Lancet. Infectious diseases*, *2*(2), 73–85. [https://doi.org/10.1016/s1473-3099\(02\)00181-0](https://doi.org/10.1016/s1473-3099(02)00181-0)

Santos, S.B.D., Sabadin, C.E.S., Mário, D.N., Rigo, L.B.D. (2018) Presence of *Candida* spp. and candidiasis in liver transplant patients. *Um Bras Dermatol*, *93*(3),

356–361.

Scotti, L., Tullius Scotti, M., de Oliveira Lima, E., Sobral da Silva, M., do Carmo Alves de Lima, M., da Rocha Pitta, I., Olímpio de Moura, R., Gonzaga Batista de Oliveira, J., Duarte da Cruz, R. M., & Bezerra Mendonça Junior, F. J. (2012). Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *17*(3), 2298–2315. <https://doi.org/10.3390/molecules17032298>

Silva, D. R., Rosalen, P. L., Freires, I. A., Sardi, J., Lima, R. F., Lazarini, J. G., Costa, T., Pereira, J. V., Godoy, G. P., & Costa, E. (2019). Anadenanthera Colubrina vell Brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. *Brazilian oral research*, *33*, e023. <https://doi.org/10.1590/1807-3107bor-2019.vol33.0023>

Srinivas, N., Sandeep, K.S., Anusha, Y., Devendra, B.N. (2014). *In Vitro* cytotoxic evaluation and detoxification of monocrotaline (Mct) alkaloid: An *In silico* approach. *Intenational Invention Journal of Biochemistry Bioinformatics*, *2*(3),20-29.

Touil, H., Boucherit, K., Boucherit-Otmani, Z., Khoder, G., Madkour, M., & Soliman, S. (2020). Optimum inhibition of amphotericin-B-resistant *Candida albicans* strain in single- and mixed-species biofilms by *Candida* and non-*Candida* terpenoids. *Biomolecules*, *10*(6), 847. <https://doi.org/10.3390/biom10060847>

Wang, W. P., Yan, X. L., Ni, Y. F., Guo, K., Ke, C. K., Cheng, Q. S., Lu, Q., Zhang, L. J., & Li, X. F. (2013). Effects of lipid emulsions in parenteral nutrition of esophageal cancer surgical patients receiving enteral nutrition: a comparative analysis. *Nutrients*, *6*(1),111–123. <https://doi.org/10.3390/nu6010111>

Wang, L., Jiang, N., Wang, D., & Wang, M. (2019). Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*. *Toxins*, *11*(10), 553. <https://doi.org/10.3390/toxins11100553>

Wińska, K., Mączka, W., Łyczko, J., Grabarczyk, M., Czubaszek, A., & Szumny, A. (2019). Essential oils as antimicrobial agents-myth or real alternative?. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *24*(11), 2130. <https://doi.org/10.3390/molecules24112130>

Xia, H., Liang, W., Song, Q., Chen, X., Chen, X., & Hong, J. (2013). The in vitro study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. *Cytotechnology*, *65*(1), 49–57. <https://doi.org/10.1007/s10616-012-9453-2>

Zeba, N., Siddiqui Farheen Farooq T.N., Mohammed Musthafa, A. A., Khan, A.U. (2013). Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. *Journal of Saudi Chemical Society*, *17*(2), 237-243.

Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, *18*(13), 1181–1190. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.008>

6.3 Avaliação de hidrogel incorporado ao citral para tratamento de candidose bucal

Artigo submetido a Archives of Oral Biology

Fator de impacto: 2.633

Avaliação de hidrogel incorporado ao citral para tratamento de candidose bucal

Resumo

Esse estudo desenvolveu um hidrogel incorporado ao citral (HC), realizou a caracterização físico-química e avaliou, *in vitro* a suscetibilidade microbiana sobre *Candida* spp e a cinética de crescimento. Analisou a toxicidade aguda e a mutagenicidade *in vivo* do citral. Foram utilizadas as cepas: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019 e cepas clínicas de *C. albicans* A4, *C. albicans* A5 e *C. albicans* A6. Verificou-se a suscetibilidade microbiana pelo teste de disco-difusão em ágar e o efeito sobre a cinética de crescimento de *C. albicans*. A toxicidade aguda e o potencial clastogênico e aneugênico foram avaliados em camudongos *Mus musculus*. Os dados foram analisados por estatística descritiva e inferencial. O HC apresentou halos de inibição dependendo da concentração analisada, para todas as cepas de *Candida* testadas, sendo classificadas como sensíveis. O produto nas concentrações de CIM, 2xCIM e 4xCIM inibiu significativamente o crescimento de *C. albicans* ATCC 10231, entre 15 a 120 minutos, quando comparada ao controle de crescimento. O HC não induziu clinicamente sinais de toxicidade aguda nos camudongos quando submetidos ao tratamento por via oral na dose única de 2000 mg/kg. O HC produziu menor número de micronúcleos estatisticamente significativo comparado ao controle positivo (ciclofosfomida a 50 mg/kg) em eritrócitos de camudongos. O hidrogel incorporado ao citral demonstrou ser um potencial agente antifúngico contra espécies de *Candida*, com baixa toxicidade e mutagenicidade.

Palavras-chave: Atividade antifúngica. *Candida* spp. Monoterpeno. Toxicidade, Sistemas de liberação de fármacos.

Abstract

This study developed a citral-based hydrogel (HC), performed the physical-chemical characterization and evaluated, *in vitro*, the microbial susceptibility to *Candida* spp and

the growth kinetics. It analyzed the acute toxicity and *in vivo* mutagenicity of citral. Strains were used: *C. albicans* ATCC 10231, *C. glabrata* ATCC 90030, *C. krusei* ATCC 6258, *C. tropicalis* ATCC 750, *C. parapsilosis* ATCC 22019 and clinical strains of *C. albicans* A4, *C. albicans* A5 and *C. albicans* A6. Microbial susceptibility was verified by the disk-diffusion test on agar and the effect on the growth kinetics of *C. albicans*. Acute toxicity and clastogenic and aneugenic potential were evaluated in *Mus musculus* mice. Data were analyzed using descriptive and inferential statistics. The HC showed halos of inhibition depending on the concentration analyzed, for all strains of *Candida* tested, being classified as sensitive. The product at the concentrations of MIC, 2xCIM and 4xCIM significantly inhibited the growth of *C. albicans* ATCC 10231, between 15 and 120 minutes, when compared to the growth control. HC did not clinically induce signs of acute toxicity in mice when submitted to oral treatment at a single dose of 2000 mg/kg. HC produced a statistically significant smaller number of micronuclei compared to the positive control (cyclophosphamide 50 mg/kg) in erythrocytes from mice. The citral-based hydrogel proved to be a potential antifungal agent against *Candida* species, with low toxicity and mutagenicity.

Keywords: Antifungal Activity. *Candida* spp, Monoterpene. Toxicity. Drug delivery systems.

Introdução

A candidose é uma das infecções bucais oportunistas mais comuns que apresenta diferentes apresentações clínicas agudas e crônicas com diversas abordagens diagnósticas e terapêuticas (QUINDOS et al., 2019b; SAKAGUCHI, 2017). Pode ser categorizada em três tipos: pseudomembranosa pelo aparecimento de lesão branca, a eritematosa pela erupção de eritema e hiperplásica por hiperplasia da mucosa (SAKAGUCHI, 2017).

É frequente em pacientes imunossuprimidos sistematicamente muito jovens ou muito idosos, com condições imunocomprometedoras como HIV/Aids, uso crônico de esteróides/antibióticos sistêmicos e corticosteróides inalatórios (para tratamento preventivo da asma e da doença pulmonar obstrutiva crônica) (SAKAGUCHI, 2017; TAYLOR; RAJA, 2021).

Nistatina, miconazol e fluconazol são muito eficazes no tratamento dessa doença. As alternativas sistêmicas para infecções recorrentes são os novos triazóis, equinocandinas ou apresentações lipídicas da anfotericina B (QUINDOS et al., 2019b). Porém, o uso excessivo de medicamentos antifúngicos, toxicidade sistêmica,

reatividade cruzada com outras drogas e um número atualmente baixo de moléculas de ativos com atividade antifúngica têm contribuído para importantes limitações clínicas (RODRIGUES; RODRIGUES; HENRIQUES, 2019).

O desenvolvimento de produtos naturais com aplicação clínica é necessário para criar novas estratégias de controle da candidose bucal devido às desvantagens e fragilidades dos produtos comercialmente disponíveis. Os produtos naturais são alternativas terapêuticas promissoras porque tendem a apresentar reações adversas muito menores e de menor intensidade em comparação aos medicamentos alopáticos (FONSECA et al., 2014).

O citral é um composto presente em diversos óleos essenciais utilizados pela população, e o principal componente do *Cymbopogon citratus*. Algumas de suas propriedades farmacológicas tem sido relatadas na literatura como antitumoral (XIA et al, 2013), broncodilatadora (MANGPRAYOOL; KUPITTAYANANT; CHUDAPONGSE, 2013), antiprotozoária (CARDOSO; SOARES, 2010) e antimicrobiana (FREIRE et al, 2017; LEITE et al, 2014; LIMA et al, 2012; ZORE et al, 2011).

O uso de hidrogéis na liberação de ativos tem sido explorado devido à sua biocompatibilidade, facilidade de encapsulação de fármacos e potencial para conferir propriedades mecânicas e estruturais semelhantes ao tecido biológico (SERRA et al., 2020). Para a administração tópica de medicamentos, os hidrogéis bioadesivos são ideais, pois podem fornecer liberação prolongada de agentes terapêuticos, como antimicrobianos, para a mucosa bucal (KONG et al., 2016a).

Pelas limitações dos antifúngicos utilizados no tratamento da candidose bucal e a constatação de efeito antimicrobiano do citral, esse estudo desenvolveu um hidrogel incorporado ao citral (HC), realizou a caracterização físico-química da formulação, analisou a susceptibilidade microbiana e cinética de crescimento *in vitro*, a toxicidade aguda *in vivo* e a genotoxicidade em eritrócitos de camundongos.

Material e Métodos

Realizou-se um estudo *in vitro* e *in vivo* que adotou um modelo de pesquisa animal de roedores, sendo caracterizado como estudo *in vivo* controlado e

randomizado. A presente pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual da Paraíba/UEPB, sob número de parecer 009/2021.

Desenvolvimento do hidrogel a partir do citral (HC)

Preparação do hidrogel de Aristoflex AVC com e sem citral

O hidrogel foi obtido levando em consideração a proporção peso/volume em porcentagem. Os parabenos foram dissolvidos em propilenoglicol, adicionada a água aquecida até 70°C, agitando até completa dissolução. Após retirada do aquecimento e, sob agitação moderada, uma solução 2,5% (m/v) de Aristoflex AVC foi preparada dissolvendo-o (2,5g) em água ultrapurificada (q.s.p. 100 mL) até completa dispersão do gel. Em seguida, o gel foi resfriado até 40°C e adicionado o Phenonip (FERREIRA, 2008).

Posteriormente, diferentes proporções (m/v) do citral foram adicionadas ao hidrogel, com o intuito de verificar a capacidade máxima de incorporação do hidrogel sem alterar suas características físico-químicas.

Análises físico-químicas do HC

Análise do potencial hidrogeniônico (pH)

A análise de pH da formulação foi realizada em pHmêtro digital, GEHAKA previamente calibrado com soluções tampão de fosfato e biftalato pH 7,0 e 4,0. A formulação foi diluída na proporção de 1:10 em água purificada, e o eletrodo foi inserido diretamente, sob temperatura ambiente (25°C) para verificação do potencial hidrogeniônico da formulação em relação ao tempo, conforme a orientação da ANVISA para produtos semissólidos (DAMASCENO et al., 2012).

Determinação da resistência à centrifugação

Para determinação da resistência à centrifugação das amostras, foi realizada de acordo com o Guia de estabilidade de cosméticos da ANVISA. Amostras de 2,0 g foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 30 minutos. O teste produziu estresse nas formulações, simulando um aumento de fora de gravidade, podendo antecipar possíveis instabilidades, acelerando o aparecimento dessas (BRASIL, 2004; FORMARIZ et al., 2010).

Determinação da Viscosidade

Para avaliação da viscosidade empregou-se o viscosímetro rotativo digital de BROOKFIELD, da Fungilab Viscolead, modelo One, no qual a amostra foi medida por velocidade de rotação de eixo metálico, com cone coaxial *spindle* R7, imerso no material. Uma quantidade de 10 g de amostra, após verificação da ausência de bolhas, sob temperatura ambiente (25°C), foi acondicionada em frasco de polietileno cristal. A análise foi realizada, sob agitação rotacional variável, sob velocidade de rotação descendente. A leitura foi realizada, em triplicata, com valor em centipoise (cP), de acordo com a capacidade de leitura do aparelho (KONG et al., 2016).

Determinação da Espalhabilidade

Para determinar a espalhabilidade das amostras, uma placa circular de vidro, com diâmetro de (20 cm x 20 cm) e 0,2 mm de espessura, foi colocada sobre outra placa de suporte de mesma largura, entre ambas as placas, foi posicionado uma folha de papel milimetrado e em seguida adicionado uma terceira placa, com orifício central de 1,2 cm de diâmetro. A amostra foi introduzida no orifício da placa e a superfície nivelada com uma espátula. Após a aplicação da amostra retirou-se completamente esse molde e sob esse material, foi disposto uma placa, com peso pré-determinado. Após 1 minuto, foi calculada a superfície abrangida através da medição do diâmetro em duas posições opostas, calculando o diâmetro médio. Este procedimento foi repetido, com a adição de 10 placas adicionadas sobre a amostra. Os resultados foram expressos em espalhabilidade da amostra em função do peso adicionado. As análises foram realizadas em triplicata. A equação 1 foi utilizada para os cálculos de espalhabilidade (WATHONI et al., 2020).

$$E_i (max) = \frac{d^2 \cdot \pi}{4} \quad \text{Equação 1}$$

Onde:

E_i : é a espalhabilidade da amostra para o peso i , em mm^2 ;

d : é o diâmetro médio, em milímetros.

Suscetibilidade microbiana e cinética de crescimento

Teste de suscetibilidade microbiana por disco-difusão em ágar

O teste de difusão em disco aceito pelo FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards) foi realizado para avaliação da suscetibilidade antimicrobiana, de acordo com recomendações do CISI (2009a), com adaptações (BARRY; THORNSBERRY; BARRY, 1991). O ensaio foi realizado em triplicata e em dias alternados.

Foi utilizado para os testes o meio Ágar Saboroud Dextrose (ASD), preparado de acordo com especificações do fabricante, placas de Petri de 100x15mm de modo a possibilitar uma camada de 4mm de ágar. Foram utilizadas cepas da *American Type Culture Collection* (ATCC): *Candida albicans* (ATCC 10231), *Candida glabrata* (ATCC 90030), *Candida krusei* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (ATCC 750), *Candida parapsilosis* (22019), provenientes da Fundação Oswaldo Cruz/RJ e isolados clínicos: *Candida albicans* (A4, A5 e A6). As concentrações testadas do HC foram de 62,5 a 2500 µg/mL, e da nistatina variaram entre 8 a 640 µg/mL.

Para o teste de disco-difusão em ágar, a suspensão de leveduras foi preparada em solução salina fisiológica (NaCl 0.85%) com turbidez equivalente ao tubo 2 da escala de McFarland (5×10^6 células/mL). As placas foram inoculadas através da técnica de inundação da superfície do meio de cultura com uma suspensão fúngica nas diluições de 1:1 e 1:2, retirando-se o excesso do líquido com o auxílio de uma pipeta Pasteur. As placas foram mantidas entreabertas em estufa a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 15 minutos para secagem.

Os discos estéreis de papel filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com uma alíquota de 50 µL do HC de cada concentração a ser testada e, em seguida, foram colocados com pinça estéril sobre o meio CSD na placa de Petri, no qual foi previamente inoculado com o microrganismo testado, e pressionados levemente sobre a superfície do meio. Em cada placa foram colocados cinco discos obedecendo a distância de 20mm entre os discos e 15mm a partir da borda da placa. O controle positivo foi realizado com nistatina e o controle negativo com o hidrogel sem a incorporação do citral. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por um período de 24 a 48 horas.

A leitura foi efetivada, verificando-se a ocorrência da atividade antifúngica, através do aparecimento de halos de inibição em torno dos discos contendo o hidrogel. Os diâmetros dos halos de inibição foram mensurados com um paquímetro digital, incluindo o diâmetro do disco. Os halos de inibição para os produtos testados foram interpretados nas categorias sensível, intermediário ou resistente, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M100-S18 2008, M2-A9, 2006 (documento de disco difusão) (WEINSTEIN et al., 2020).

Cinética de crescimento microbiano

Foram realizados ensaios de crescimento dependentes da concentração de células de *C. albicans* e dependentes do tempo de exposição de acordo com metodologia de Sultan et al (2019) com adaptações. Adicionou-se 15 µl de inóculo nas concentrações de 5×10^3 , 5×10^4 , 5×10^5 e 5×10^6 UFC/ml de *C. albicans* ATCC 10231 a 60 µl do produto teste em diferentes concentrações em tubos Eppendorf de 1 ml e incubados a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 120 min. Após a incubação nos intervalos de 15, 30 e 120 min, as alíquotas foram semeadas em ASD e incubadas por 24 h a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ para contagem de colônias viáveis (SULTAN et al., 2019).

Foram testados HC (62,5 µg/mL, 125 µg/mL e 250 µg/mL), nistatina (16 µg/mL, 32 µg/mL e 64 µg/mL) e a base do hidrogel. O controle de crescimento foi realizado e o experimento feito em triplicata em dias alternados. Para análise do crescimento microbiano dependente do tempo, os experimentos foram realizados conforme descrito utilizando 5×10^3 *C. albicans* ATCC 10231.

Análises de Toxicidade

Toxicidade aguda *in vivo* do HC em camundongos

Para a realização desse teste foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos fêmeas, linhagem Swiss, idade seis semanas. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório, sob temperatura $23 \pm 1^\circ\text{C}$, ciclo de claro e escuro controlado de 12h, todos provenientes do Centro Bioterismo da Universidade Estadual da Paraíba. Os mesmos foram distribuídos nos diferentes grupos experimentais ao acaso e durante o experimento alojados em gaiolas (542 cm²) do tipo microisoladoras com grade, tampa e sistema de válvulas para insuflamento e exaustão de ar. Tais

gaiolas apresentam forração com maravalhas de *Pinus*, esterilizada por radiação gama.

O grupo experimental foi tratado com HC, os animais receberam uma dose de 2000 mg/kg. No grupo controle foi utilizado o veículo (hidrogel sem incorporação do citral) (OECD, 2001). Ambas substâncias administradas por via oral. Cada grupo foi composto por três animais (fêmeas), totalizando seis animais.

O ganho de peso dos animais pode ser afetado pela dificuldade na digestão e absorção de alimentos e nutrientes, uma indicação de possível efeito tóxico. A Organization of Economic Co-operation and Development (OECD) considera aceitável uma variação de até 20% do peso corporal. Além das variações comportamentais, a toxicidade de um composto pode ser avaliada por meio de mudanças no ganho de peso animal, redução no consumo de água e comida, e alterações na excreção de urina e fezes (OECD, 2001).

Sinais clínicos de toxicidade incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas foram observados, além disso, parâmetros como alteração da locomoção, frequência respiratória, diarreia, sialorréia, convulsões, hiperexcitabilidade do sistema nervoso central, contorções abdominais, número de animais mortos com possível causa de morte e respectivos exames histopatológicos foram investigados. A observação se deu nas primeiras quatro horas após administração do hidrogel (sem ou com HC), nos períodos de 0, 15, 30 e 60 minutos. Após findar a primeira hora, o acompanhamento ocorreu a cada 60 minutos até se completarem as quatro horas. Durante os 14 dias após administração do hidrogel (sem ou com HC), as observações foram diárias e sempre no mesmo horário do início do experimento (BRASIL, 2004).

O consumo de comida e água foi monitorado diariamente, e o peso corporal registrado no dia 0 (antes da dosagem) e dia 14. Após esse período, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso (30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de cetamina), por via intraperitoneal. Em seguida foi realizada a excisão de material biológico (coração, estômago, fígado, baço e rins).

Seus órgãos foram examinados macroscopicamente, a ressecção foi feita com consecutiva pesagem do coração, estômago, fígado, baço e rins. Os índices de órgãos foram calculados de acordo com a equação: índice = peso do componente (g)/peso do animal(g)x100. As secções de tecido dos órgãos excisados, foram fixadas em solução de formaldeído a 10%, após 72 horas foi realizada a clivagem para o

processamento histopatológico com a finalidade de observar qualitativamente através da presença ou ausência sinais de toxicidade como: hiperemia, presença de infiltrado inflamatório, binucleação, sinusóides dilatados e megalocitose (no fígado), mineralização da luz tubular (nos rins) (MAGALHÃES et al., 2018).

Teste do micronúcleo

Para a realização desse teste foram utilizados camundongos *Mus musculus* albinos machos e fêmeas, linhagem *Swiss*, idade sete semanas. Os animais foram aclimatados e alimentados nas mesmas condições acima citadas.

Foram utilizados três grupos experimentais, contendo cada grupo um total de três machos e três fêmeas, totalizando 18 animais (BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2013).

O grupo teste foi tratado a partir da administração por via oral de HC na dose de 2000 mg/kg. O grupo controle negativo recebeu tratamento apenas com hidrogel sem incorporação do citral e o grupo controle positivo recebeu administração do agente mutagênico ciclofosfamida numa dose de 50 mg/Kg de peso do animal.

Vinte e quatro horas após a administração do HC os animais foram anestesiados intraperitonealmente (Xilazina 10 mg/kg e Cetamina 100 mg/kg) e uma amostra de sangue foi coletada por via intracardíaca. Em seguida, os animais foram eutanasiados pela administração de anestésico em excesso por via intracardíaca (30 mg/kg de xilazina e 300 mg/kg de cetamina). As lâminas com amostras de sangue foram preparadas por esfregaço e coradas com ácido panótico para observação da presença ou ausência de micronúcleos nos eritrócitos de cada animal em microscópio óptico no aumento de 1000x. Para análise quantitativa foram considerados cinco campos por lâmina, num total de 2000 eritrócitos (HAYASHI et al., 2007). Os resultados foram expressos como a média \pm desvio padrão em comparação com o grupo controle positivo.

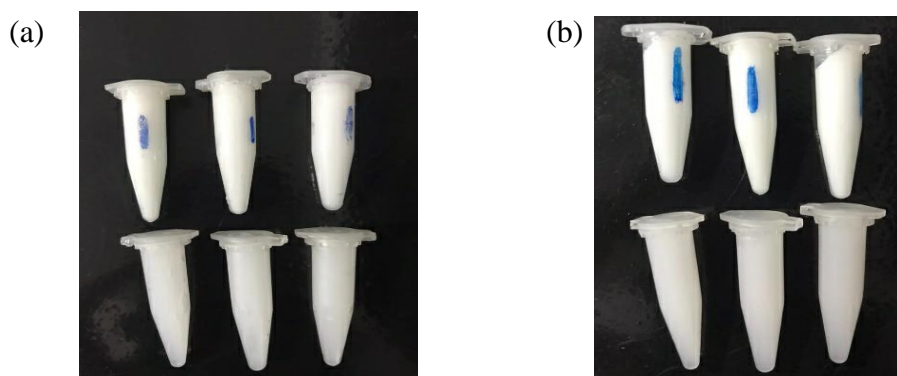
Resultados

Desenvolvimento e caracterização físico-química do HC

Resistência à centrifugação e pH

A formulação apresentou cor branco leitoso, com odor cítrico. Os valores de pH para ambas as amostras desenvolvidas foram de 5,62 para formulação do hidrogel com citral e 5,94 para a formulação controle, sem fármaco. As amostras submetidas a condições extremas, tem como objetivo acelerar as possíveis reações e instabilidades entre seus componentes, como precipitação, separação de fases, turbidez. Foi possível observar visualmente, que nenhuma das formulações apresentaram instabilidade (Figura 1), indicando que possuem tendência a permanecer estáveis fisicamente ao longo do armazenamento.

Figura 1: Amostras submetidas ao teste de resistência por centrifugação das formulações contendo o fármaco, e sem fármaco, antes da centrifugação (a) e após a centrifugação (b).



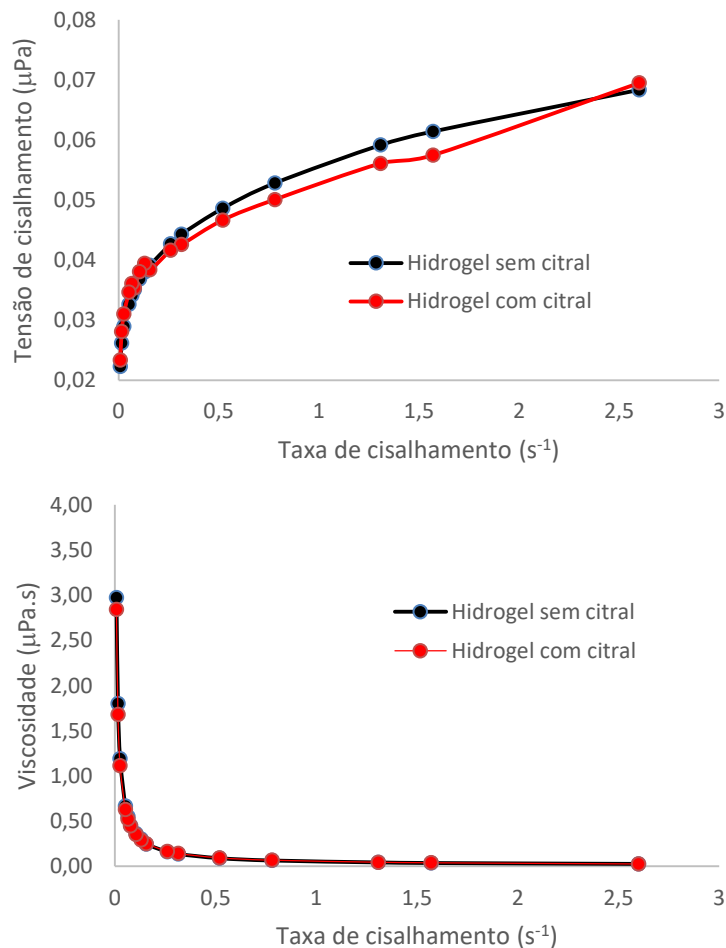
Fonte: Próprio autor.

Viscosidade

Os dois pré-requisitos para um sistema de gelificação, são a viscosidade e a capacidade de gelificação. Para instilar facilmente a formulação no local afetado na mucosa bucal, essa deve ter ótima viscosidade. Ou seja, deve sofrer uma rápida transição para um contato maior com o local afetado. Verificou-se, a partir dos reogramas apresentados na Figura 2, que à medida que a taxa de cisalhamento aumenta, a viscosidade do gel diminui, tendo um comportamento de fluido não-newtoniano pseudoplástico e variando as suas viscosidades entre 0,03 a 2,9 $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$ para o gel sem citral e 0,03 e 2,8 $\mu\text{Pa}\cdot\text{s}$, para o gel com citral. Esse tipo de comportamento preconiza que o material flui, assim que uma tensão de cisalhamento

é aplicada. Essa observação é válida para ambas as formulações, que não alteraram sua viscosidade com a adição do fármaco ao gel.

Figura 2: Curvas de fluxo (A) e viscosidade (B) em função da taxa de cisalhamento do hidrogel com citral (vermelho) e hidrogel sem citral (preto).

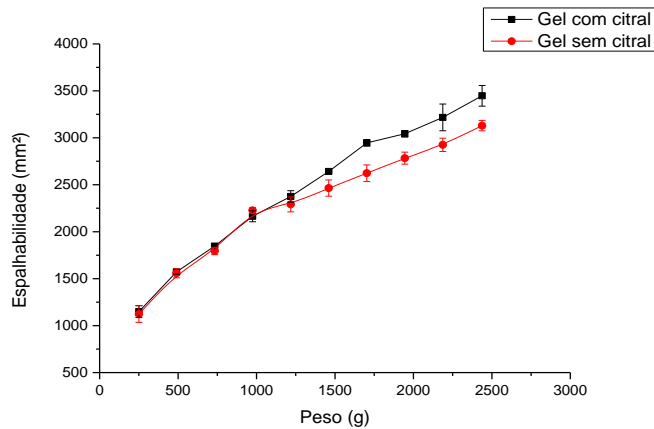


Fonte: Próprio autor.

Espalhabilidade

Os testes de espalhabilidade realizados demonstraram uma relação entre resistência ao movimento forçado desta forma farmacêutica, correspondendo à relação entre a área de espalhamento, com a força aplicada ao produto, para ambas as formulações analisadas. Porém, um aumento maior pôde ser observado a formulação com citral, havendo aumento da espalhabilidade, com aplicação de força.

Figura 3: Espalhabilidade dos géis (25°C) preparadas a partir da adição do citral e do grupo controle, gel sem citral.



Fonte: Próprio autor.

Suscetibilidade microbiana do HC e cinética de crescimento

Os resultados dos halos de inibição do teste de suscetibilidade microbiana se encontram na Tabela 1. O citral apresentou diâmetros dos halos aproximados aos da nistatina como pode se observar na Figura 4.

O maior halo de inibição observado para o HC foi de 32 mm (em CIM de 2500 µg/mL para *C. albicans* clínica A4), enquanto a nistatina demonstrou maior halo de inibição com 28 mm frente a *C. albicans* clínica A4. Tais resultados foram obtidos para o produto em maior concentração.

Houve sensibilidade de *Candida* spp frente ao HC, pois ocorreu o desenvolvimento de halos de inibição do crescimento com diferentes diâmetros iguais ou próximos a 10mm a partir da CIM de 62,5 µg/mL para *C. glabrata* (ATCC 90030), *C. glabrata* (ATCC 90030) em associação com *C. albicans* (ATCC 10231), *C. Krusei* (ATCC 6258) e *C. tropicalis* (ATCC 750); e na concentração de 250 µg/mL para *C. albicans* A5, *C. albicans* A6 e *C. parapsilosis*. Valores aproximados à nistatina considerada padrão ouro na clínica odontológica no tratamento da candidose bucal: esta apresentou halos de inibição maior ou igual a 10 mm a partir de 16 µg/mL para *C. albicans* A5, *C. albicans* A6 e *C. parapsilosis*; 64 µg/mL para *C. albicans* A4, *C. glabrata*, *C. glabrata* associada a *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. tropicalis*.

Tabela 1: Média dos halos de inibição (mm) e desvio-padrão para cada concentração de hidrogel a base de citral testada ($\mu\text{g/mL}$) contra espécies de *Candida*.

<i>C.albicans</i> ATCC 1031	HC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	62,5	125	250	500	625	1250	1875	2500
		Zona de inibição	8	9	10	13	16,33	33	30	30,5
		Média (DP)	± 0	± 0	± 0	$\pm 1,73$	$\pm 0,58$	$\pm 1,73$	± 0	$\pm 0,58$
	Nistatina	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	16	32	64	128	160	320	480	640
		Zona de inibição	6,6	7,6	8,6	10	10	12,33	15,33	17
		Média (DP)	$\pm 1,15$	$\pm 1,15$	$\pm 1,15$	$\pm 0,58$	± 0	$\pm 2,08$	$\pm 4,51$	$\pm 11,5$
<i>C.albicans</i> clínica A4	HC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	62,5	125	250	500	625	1250	1875	2500
		Zona de inibição	9,1	9,38	10,5	19	24	28,5	31,33	32,33
		Média (DP)	$\pm 0,18$	$\pm 0,66$	$\pm 3,04$	$\pm 0,6$	± 6	$\pm 8,87$	$\pm 10,07$	$\pm 9,07$
	Nistatina	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	8	16	32	64	80	160	240	320
		Zona de inibição	7,33	8,33	9	11,5	13	16,33	16	16,33
		Média (DP)	$\pm 0,58$	$\pm 0,58$	± 1	$\pm 2,9$	$\pm 4,53$	$\pm 0,61$	± 1	$\pm 1,15$
<i>C.Krusei</i> ATCC 6258	HC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	62,5	125	250	500	625	1250	1875	2500
		Zona de inibição	12	12	15,67	19	21,33	20	20,67	24
		Média (DP)	± 1	$\pm 1,73$	$\pm 1,15$	$\pm 1,73$	$\pm 3,21$	$\pm 0,64$	$\pm 1,15$	$\pm 1,73$
	Nistatina	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	8	16	32	64	80	160	240	320
		Zona de inibição	6	6,33	6,66	7	9	10,67	14,67	19,67
		Média (DP)	± 0	$\pm 0,58$	$\pm 1,15$	$\pm 1,73$	$\pm 1,73$	$\pm 1,15$	$\pm 0,58$	$\pm 0,58$
<i>C.glabata</i>	HC	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	250	500	1000	2000	2500	5000	7500	10000

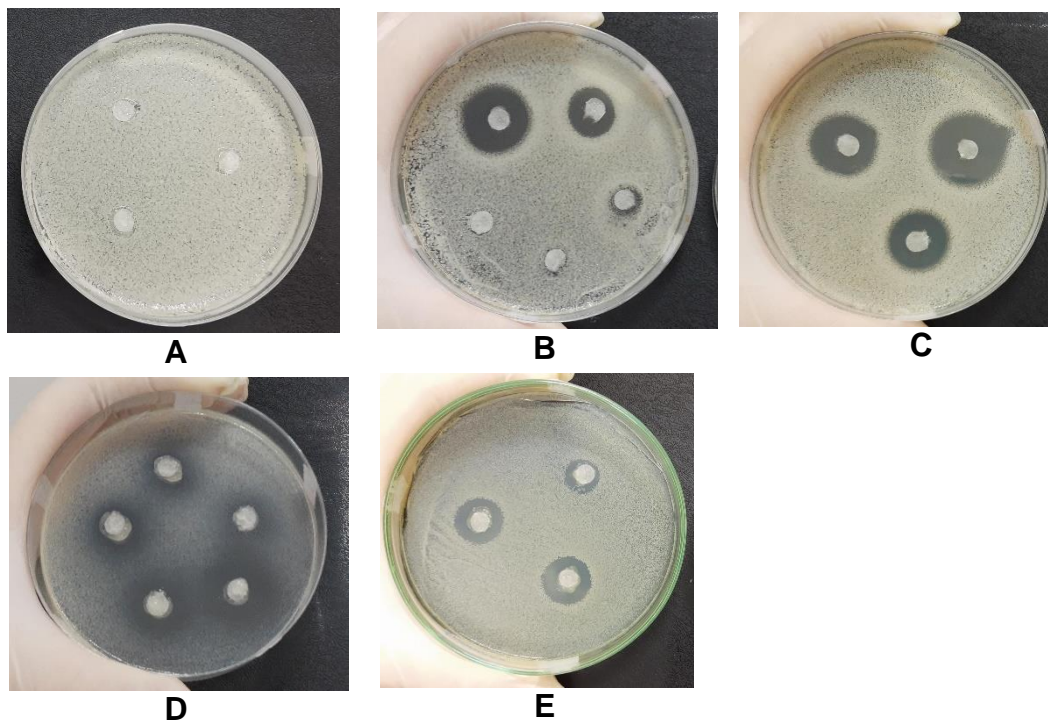
ATCC 90030		Zona de inibição	10,4	11,87	12,85	15,52	17,26	16,83	17,83	19,61
		Média (DP)	±1,94	±1,53	±1,55	±0,61	±1,38	±0,29	±0,65	±1,42
		CIM (µg/mL)	16	32	64	128	160	320	480	640
Nistatina		Zona de inibição	8,49	9,45	13,12	16,90	18,15	19,26	20,37	21,83
		Média (DP)	±0,24	±1,01	±2,35	±1,99	±1,57	±1,58	±2	±0,81
		CIM (µg/mL)	250	500	1000	2000	2500	5000	7500	10000
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030+	HC	Zona de inibição	10,95	11,75	12,10	13,59	14,76	14,94	18,57	20,94
		Média (DP)	±1,88	±1,99	±2,12	±1,11	±1,3	±1,24	±1,04	±0,76
		CIM (µg/mL)	16	32	64	128	160	320	480	640
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	Nistatina	Zona de inibição	7,08	8,32	10,01	14,47	16,77	19,54	21,39	23,94
		Média (DP)	±0,21	±0,86	±1,03	±2,1	±1,14	±2	±2,55	±2,3
		CIM (µg/mL)	250	500	1000	2000	2500	5000	7500	10000
C. <i>tropicallis</i>	HC	Zona de inibição	10,41	11,18	11,72	13,26	15,40	16,48	17,34	19,51
		Média (DP)	±0,41	±2,7	±2,69	±2,77	±8,9	±1,66	±4,72	±4,3
		CIM (µg/mL)	8	16	32	64	80	160	240	320
ATCC 750	Nistatina	Zona de inibição	6,00	7,85	7,85	13,23	15,30	17,16	19,59	22,57
		Média (DP)	±0	±0,85	±2,03	±1,23	±0,3	±1,61	±0,92	±1,41
		CIM (µg/mL)	62,5	125	250	500	625	1250	1875	2500
<i>C. albicans</i> clínica A5	HC	Zona de inibição	14,50	13,05	14,17	14,56	15,60	20,20	21,23	24,31
		Média (DP)	±0,22	±2,97	±7,22	±5,43	±4,08	±0,35	±0,4	±0,54

		CIM	16	32	64	128	160	320	480	640
		($\mu\text{g/mL}$)								
	Nistatina	Zona de inibição	11,22	12,86	15,98	18,19	19,63	20,80	23,57	25,15
		Média	$\pm 2,11$	$\pm 1,13$	$\pm 5,75$	$\pm 4,68$	$\pm 3,61$	$\pm 0,9$	$\pm 0,66$	$\pm 0,86$
		(DP)								
		CIM	62,5	125	250	500	625	1250	1875	2500
		($\mu\text{g/mL}$)								
	HC	Zona de inibição	11,20	12,13	12,49	12,78	12,37	16,02	16,43	19,23
		Média	$\pm 0,63$	$\pm 1,5$	$\pm 0,24$	$\pm 0,69$	$\pm 1,1$	$\pm 0,18$	$\pm 0,53$	$\pm 1,19$
		(DP)								
<i>C.albicans</i>										
clínica A6		CIM	16	32	64	128	160	320	480	640
		($\mu\text{g/mL}$)								
	Nistatina	Zona de inibição	10,89	12,74	16,90	20,72	22,80	24,10	24,42	28,14
		Média	$\pm 0,4$	$\pm 1,34$	$\pm 1,7$	$\pm 1,19$	$\pm 0,75$	$\pm 3,25$	$\pm 2,42$	$\pm 1,54$
		(DP)								
		CIM	62,5	125	250	500	625	1250	1875	2500
		($\mu\text{g/mL}$)								
	HC	Zona de inibição	10,12	11,03	12,03	13,08	13,13	15,17	14,69	16,81
		Média	$\pm 2,07$	$\pm 1,45$	$\pm 1,29$	$\pm 0,19$	$\pm 0,11$	$\pm 0,27$	$\pm 0,53$	$\pm 1,4$
		(DP)								
<i>C. parapsilosis</i>										
ATCC 22019		CIM	16	32	64	128	160	320	480	640
		($\mu\text{g/mL}$)								
	Nistatina	Zona de inibição	10,45	10,98	12,43	14,52	16,92	14,29	17,33	18,65
		Média	$\pm 1,91$	$\pm 2,45$	$\pm 1,62$	$\pm 1,29$	$\pm 1,72$	$\pm 4,56$	$\pm 2,86$	$\pm 2,26$
		(DP)								

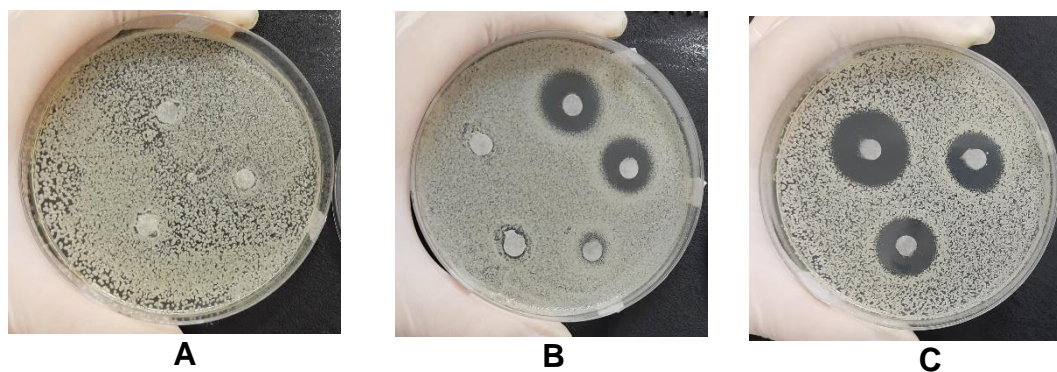
Fonte: Próprio autor.

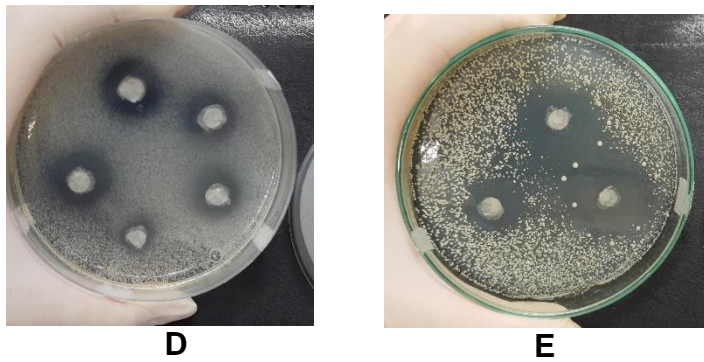
Figura 4: Halos de inibição do teste de suscetibilidade em disco-difusão em ágar para as diferentes cepas de *Candida*. (A) base de hidrogel sem citral. B e C Nistatina em diferentes concentrações. D e E Hidrogel incorporado ao citral em diferentes concentrações.

***C. glabrata* ATCC 90030**

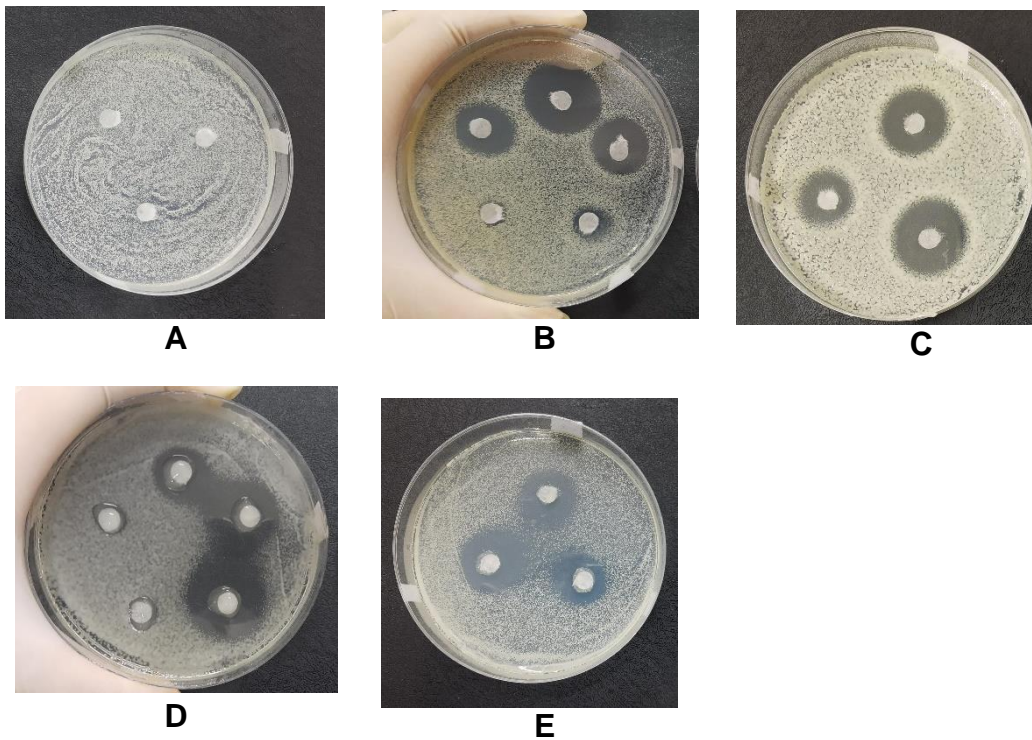


***C. tropicalis* ATCC 750**





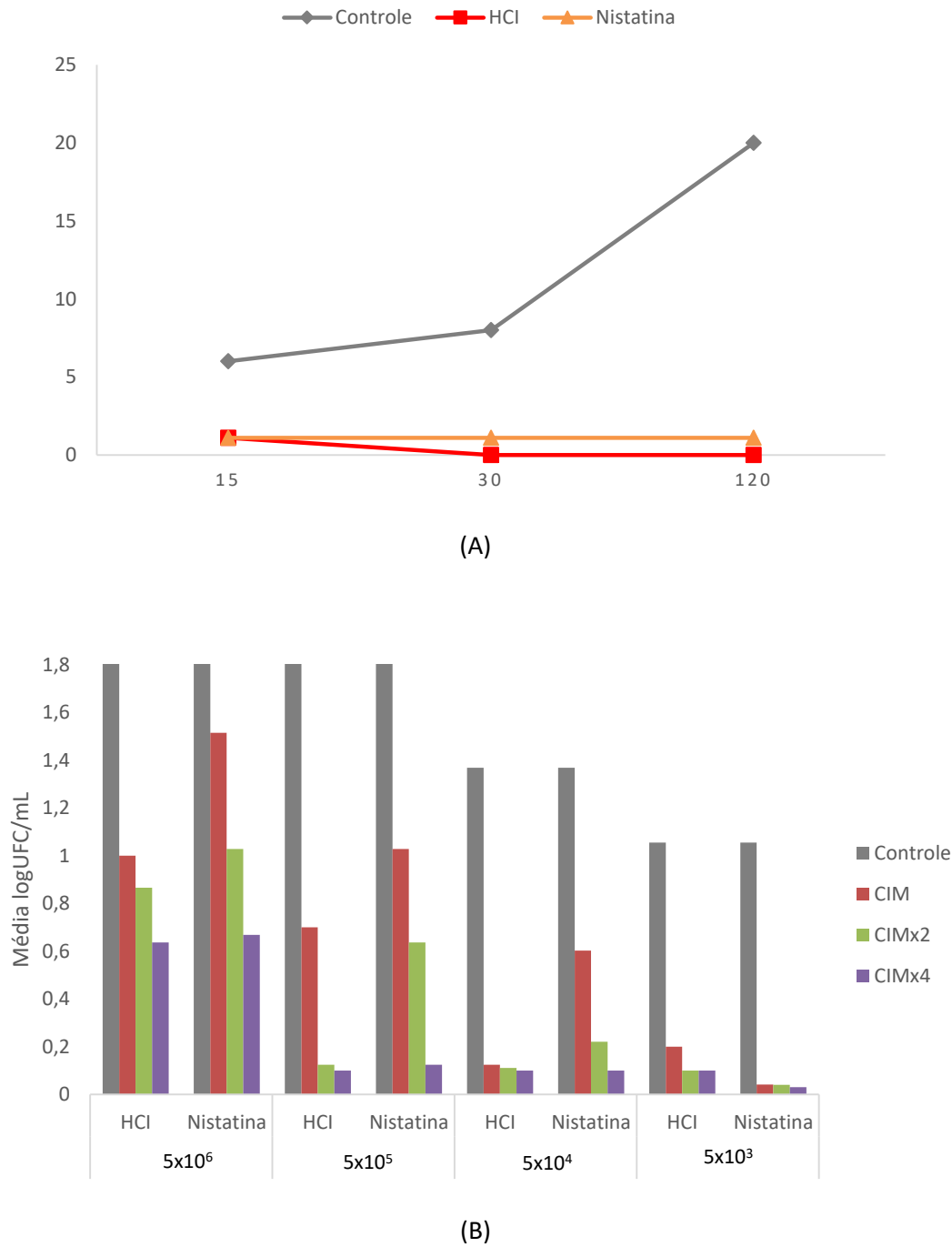
***C. albicans* clínica A5**



Fonte: Próprio autor.

A análise de crescimento microbiano demonstrou que o HC e nistatina em suas respectivas CIMs inibiram significativamente o crescimento de *C. albicans* (ATCC 10231) (5×10^3 UFC/mL) em comparação ao grupo controle de crescimento nos tempos analisados (ANOVA, $p=0,03$ e Tukey, $p<0,05$) (Figura 5A). Avaliando o comportamento de diferentes concentrações de inóculo, HC e nistatina inibiram significativamente o crescimento de *C. albicans* ATCC 10231 em comparação ao grupo controle de crescimento em CIM, 2xCIM e 4xCIM (ANOVA seguido de pós teste de Tukey, $p<0,05$) (Figura 5B).

Figura 5: A) Cinética de crescimento microbiano de *C.albicans* ATCC 10231 numa concentração de inóculo de 5×10^3 UFC/mL submetida ao HC e nistatina, assim como o controle de crescimento, nos tempos 15, 30 e 120 minutos. **B)** Média do crescimento microbiano de *C.albicans* ATCC 10231 em logaritmo submetido aos tratamentos em diferentes concentrações para cada inóculo testado.



Fonte: Próprio autor.

Toxicidade aguda *in vivo*

O hidrogel incorporado ao citral na dose de 2.000 mg/kg administrado por via oral em camundongos fêmeas, não produziu morte e não causou alteração comportamental no período de 14 dias de observação. A massa corpórea (Figura 6A), o consumo de ração (Figura 6B) e o consumo de água (Figura 6C) não diferenciaram do grupo controle (ANOVA - $p > 0,05$).

O peso absoluto e relativo do coração, estômago, fígado, rins e baço não foram afetados com a administração do HC na dosagem de 2000 mg/kg (Tabela 2). Também não foram encontradas alterações morfológicas externas na textura ou cor desses órgãos quando comparados ao grupo controle. As análises histopatológicas dos órgãos não demonstraram evidências de alterações morfológicas (Figura7).

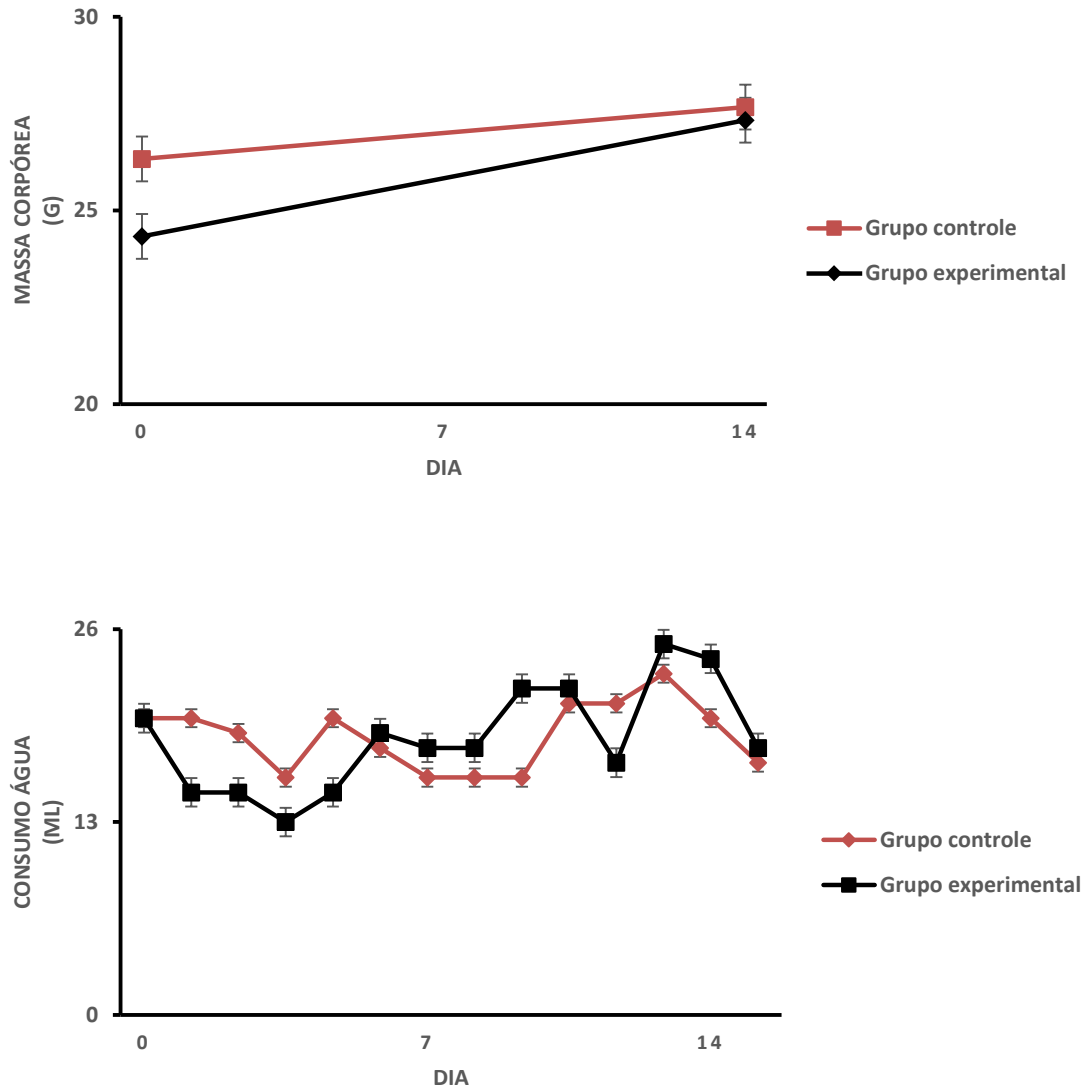
Tabela 2: Efeito hidrogel incorporado com citral (HC 2000 mg/kg), por via oral sobre o peso absoluto (g) e peso relativo (%) de camundongos *Mus musculus* fêmeas. Valores de média e desvio padrão (\pm) para $n=3$.

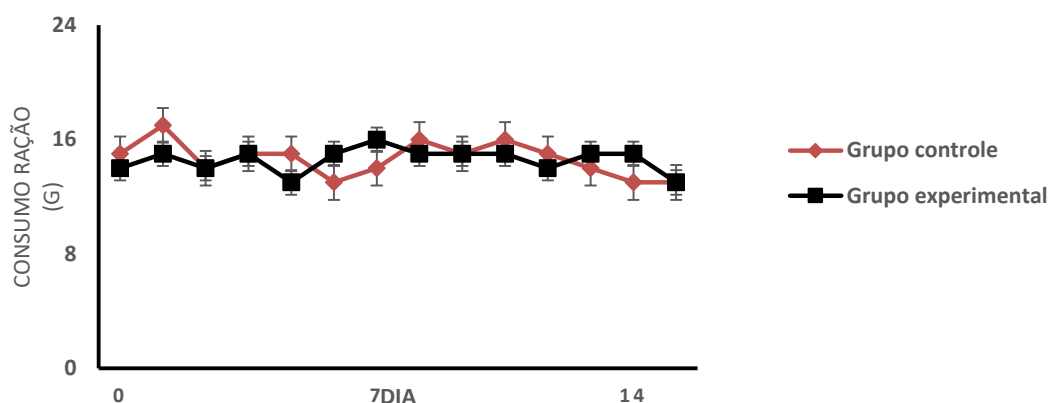
Grupo	Peso/Órgão	Coração	Estômago	Fígado	Baço	Rim
Controle	Peso absoluto	0,12 $\pm 0,007$	0,27 $\pm 0,015$	1,33 $\pm 0,138$	0,10 $\pm 0,005$	0,18 $\pm 0,007$
	Peso relativo	0,42 $\pm 0,01$	0,67 $\pm 0,491$	4,83 $\pm 0,716$	0,36 $\pm 0,040$	0,66 $\pm 0,032$
Experimental	Peso absoluto	0,12 $\pm 0,004$	0,25 $\pm 0,020$	1,44 $\pm 0,128$	0,11 $\pm 0,018$	0,18 $\pm 0,008$
	Peso relativo	0,43 $\pm 0,026$	0,91 $\pm 0,074$	5,28 $\pm 0,396$	0,40 $\pm 0,084$	0,66 $\pm 0,015$

Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos testados, ANOVA ($p > 0,05$).

Fonte: Próprio autor.

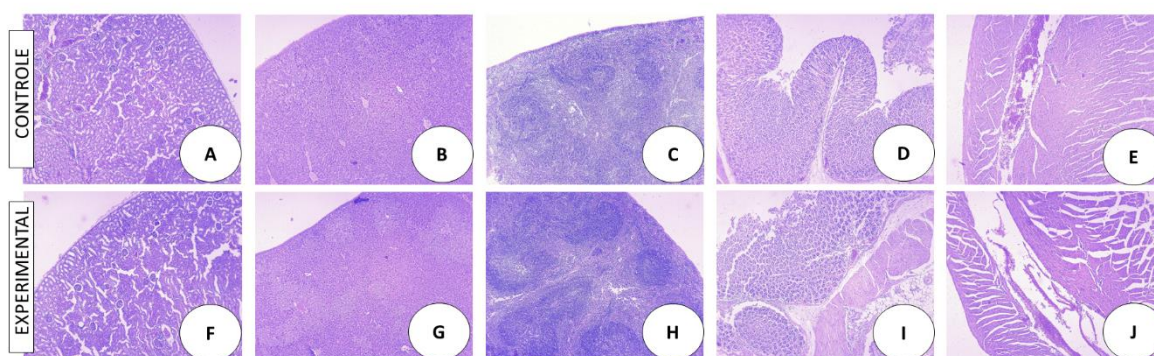
Figura 6: Efeito do hidrogel incorporado com citral (HC 2000mg/kg) sobre a massa corpórea de camundongos *Mus musculus* fêmeas (A); consumo de ração (B) e consumo de água (C). Os valores representam as médias \pm d.p.m. (n= 3/grupo). Não houve diferença significativa comparado ao grupo controle, ANOVA ($p>0,05$).





Fonte: Próprio autor.

Figura 7: A a E) Fotomicrografias de áreas dos rins, fígado, baço, estômago e coração, respectivamente, de camundongos do grupo controle. **F a J)** Fotomicrografias de áreas dos rins, fígado, baço, estômago e coração, respectivamente, de camundongos do grupo experimental, sem evidências de alterações morfológicas.



Fonte: Próprio autor.

Teste de micronúcleo em eritrócitos de camundongos *Mus musculus*, linhagem Swiss

A tabela 3 demonstra os valores médios do Teste de micronúcleo do HC. Após administração de uma dose única de 2.000 mg/kg, foi observado que o HC não induziu um aumento na frequência de micronúcleos quando comparado com o grupo de controle ($p > 0,05$) (Tabela 3 e Figura 8).

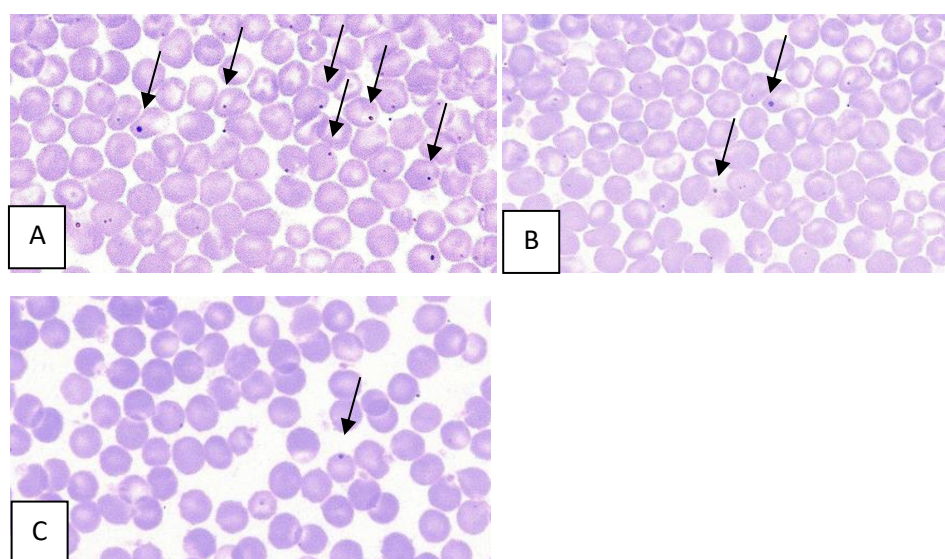
Tabela 3: Teste de micronúcleo de HC (2000mg/kg) em células de sangue periférico de camundongos e os respectivos controles.

Tratamento	Eritrócitos micronucleados (Média ± S.D.) ¹
Ciclofosfomida 50mg/kg (controle positivo)	15,5±1,93 ^a
Veículo (controle negativo)	1,83±0,965 ^b
HC 2000 mg/kg	1,33±0,866 ^b

¹Dados representam a contagem de micronúcleos por 2000 eritrócitos.

Fonte: Próprio autor.

Figura 8: Micrografia de eritrócitos capturados com objetiva de 1000x após a administração das substâncias: **A)** Ciclofosfamida (50 mg/ kg); **B)** veículo; **C)** HC (2000 mg/kg). Morfologia celular normal e ausência de micronúcleos foram observados para todos os grupos, exceto para o controle positivo ciclofosfamida.



Fonte: Próprio autor.

Discussão

O pH é um importante fator que determina quanto erosivos os produtos podem ser. A desmineralização do esmalte induzida por ácido afeta muitos indivíduos por exposição a dietas ácidas, produtos erosivos (erosão dentária) ou ácidos provenientes do biofilme bucal (cárie dentária) (Harper et al., 2021). A saliva possui um efeito

protetor limite para o esmalte até o pH crítico 5,5. Valores de pH inferiores a este criam condições para que haja aumento da solubilidade e dissolução dos cristais de esmalte. Quando episódios de redução do pH são intercalados com maiores períodos de retorno ao pH fisiológico, há um retorno ao equilíbrio entre os íons provenientes da saliva e do esmalte dentário (Loke et al., 2016). O pH do HC foi de 5,62, sendo de caráter ácido, porém acima do pH crítico para que a saliva atue como proteção à desmineralização do esmalte dentário, quando da aplicação deste produto na cavidade bucal.

O hidrogel incorporado ao citral demonstrou estabilidade quando submetido a condições extremas, indicando permanecer estáveis fisicamente ao longo do armazenamento. O valor obtido da espalhabilidade para o hidrogel com citral foi de 11,49 cm² a 34,47 cm², comparado ao hidrogel sem citral 11,23 cm² a 31,29 cm², indicando que é facilmente espalhado por uma pequena quantidade de cisalhamento, o que resulta no aumento da capacidade do fármaco de se difundir pela mucosa bucal. Microemulsões utilizando o citral como ativo apresentaram estabilidade em função do tempo quando armazenadas em temperatura ambiente (LU et al., 2018). Uma pesquisa desenvolveu nanopartículas com 256 µg/mL de citral e este apresentou maior estabilidade na variação do tamanho das partículas ao longo do tempo com essa concentração analisada (MIRANDA-CADENA et al., 2021).

Para hidrogéis orais, os principais critérios de desempenho para uma resposta ideal são o tempo de retenção do gel na mucosa bucal, a taxa de difusão do ativo para fora do gel e a estabilidade do composto no gel, propriedades que são controladas pela composição da formulação. A viscosidade do hidrogel é um fator chave na taxa de difusão e retenção do ativo na mucosa bucal e, portanto, a composição do gel precisa ser otimizada para atender a todos esses critérios de desempenho (Kong et al., 2015). Os reogramas apresentados na Figura 2 demonstraram que à medida que a taxa de cisalhamento aumentou, a viscosidade do hidrogel a base de citral diminuiu, sugerindo sua difusão no meio para exibir seu efeito terapêutico.

Após avaliação *in vitro*, o HC demonstrou potente atividade contra *Candida* spp. Em relação à suscetibilidade microbiana, o tamanho da zona de inibição está geralmente relacionado ao nível de atividade antimicrobiana de um medicamento, e uma zona de inibição maior geralmente significa que o agente antimicrobiano é mais ativo (LU et al., 2018). A formulação desenvolvida apresentou efetividade de inibição

de todas as cepas fúngicas ensaiadas, dependendo da concentração inibitória utilizada, caracterizada pela formação de halos de inibição do crescimento microbiano com diâmetro igual ou superior a 10 mm.

Esta destacável propriedade de inibição pode ser verificada quando observado os diâmetros dos halos de inibição do crescimento fúngico (10-32 mm) frente à ação de diferentes CIMs do HC. O HC apresentou maiores halos de inibição referentes à 10xCIM (625 µg/ML) quando comparados aos da nistatina frente às cepas: *C. krusei* (ATCC 6258) (24mm contra 19mm da nistatina), *C. albicans* A4 (32mm contra 16mm da nistatina) e *C. albicans* (ATCC 10231) (30mm contra 17mm obtido pela nistatina). Isso implica dizer que o HC é promissor como agente antifúngico para tratamento da candidose bucal, por demonstrar valores de inibição próximos aos apresentados pela nistatina, considerada padrão ouro na clínica odontológica no tratamento dessa doença.

Concentrações inibitórias mínimas elevadas do HC foram testadas, para obter os resultados de inibição de crescimento fúngico, uma vez que a formulação testada *in vivo*, utilizará uma CIM dez vezes maior do que a obtida *in vitro* para que haja eficácia do medicamento. Esta CIM deverá ser menor do que a DL50 obtida a fim de não produzir toxicidade aguda *in vivo*. O HC produziu halos de inibição a partir de 10 mm a partir da CIM obtida *in vitro*. Como a DL50 do HC obtida nesse estudo foi superior a 2000 mg/kg, muito acima das CIMs das espécies estudadas, têm-se uma margem de segurança para aplicação da dosagem *in vivo* nas lesões produzidas por *Candida* ssp na cavidade bucal, sem que a mesma produza toxicidade.

Achados desse estudo demonstram ação promissora da formulação desenvolvida, tendo em vista a resistência de isolados clínicos à terapia convencional. Assim como quando estão associadas às outras espécies, como a associação observada entre *C. albicans* e *C. glabrata* em microbiota bucal, tornado-as mais patogênicas e mais resistentes. Pois o HC desenvolveu halos de inibição de crescimento para essas cepas envolvidas com a maior resistência ao tratamento por medicamentos convencionais na candidose bucal.

Resultados similares foram registrados por Silva et al. (2008) que constatou ação do citral contra todas as espécies de *Candida* com zona de inibição de diâmetro superior a 40 mm em *C. albicans*. Os autores encontraram halos entre 12 a >40mm de diâmetro para o citral nas concentrações de 1,35, 2,70 e 5,41mg contra *C. glabrata*, *C. Krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* (SILVA et al., 2008). Recentemente,

nanoemulsões produzidas com citral demonstraram atividade antimicrobiana significativa através de ensaios por disco-difusão em ágar contra as espécies bacterianas *L. monocytogenes* e *S. aureus* (LU et al., 2018).

Os halos de inibição são interpretados nas categorias sensível, intermediário ou resistente, de acordo com os critérios estabelecidos pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) M100-S18, 2008 (revisado anualmente), M2-A9, 2006 (documento de disco difusão, revisado a cada três anos), (CLSI 2006, 2008). De acordo com essa classificação, o HC mostrou-se ativo para todas as cepas ensaiadas, sendo essas classificadas como sensíveis ao HC.

Quanto à cinética de crescimento, o HC inibiu significativamente o crescimento de *C.albicans* a partir de 15 a 120 minutos de observação, desde o inóculo menos concentrado ao mais concentrado em células (UFC/mL), quando comparado ao controle de crescimento. Esses dados também foram observados para a nistatina. Tais resultados estão em consonância com outros achados da literatura que relatam que o citral inibe o crescimento de *C.albicans* a partir de 2 horas de observação (FREIRE et al., 2017; LEITE et al., 2014; LIMA et al., 2012b).

Um hidrogel bioadesivo a base de peptídeo exerceu a capacidade de inibir o crescimento de fungos inversamente proporcional à densidade celular de *C. albicans*. Ou seja, quanto menos concentrado o inóculo, maior a capacidade de inibição do crescimento das células de *C.albicans* pelo produto desenvolvido (5×10^5 a 5×10^2 UFC/mL) (SULTAN et al., 2019).

Os testes toxicológicos realizados em animais experimentais visam fornecer informações seguras sobre os efeitos tóxicos produzidos por um agente químico, a natureza desses efeitos e as doses seguras de exposição (PIRES et al., 2012). O HC pode ser considerado de baixa toxicidade aguda de acordo com o método de classes recomendado pela OECD 423 (OECD, 2001) e enquadra-se na classe 5 (DL50 superior a 2.000 mg/kg), pois não foram registrados sinais clínicos de toxicidade geral como alterações no peso corpóreo e no consumo de água e ração, como também não foram observados óbitos durante todo período experimental. A administração do HC também não promoveu evidências de alterações morfológicas nos órgãos pela análise histopatológica. As características histológicas de cada órgão foram verificadas, e não encontrou-se evidências de alterações promovidas por toxicidade aguda como:

hiperemia, presença de infiltrado inflamatório, binucleação, sinusóides dilatados e magalocitose em fígado, mineralização na luz tubular renal.

O aumento da frequência de micronúcleos após o tratamento com as substâncias em estudo é indicativo de danos no cromossomo (Hayashi et al., 2007). O método de micronúcleo baseia-se na análise da frequência de danos ocorridos ao DNA, resultantes de mitoses ou meiose celular que, em contato com agentes clastogênicos e aneugênicos podem gerar a perda de fragmentos ou de cromossomos inteiros, formando assim os micronúcleos. Os micronúcleos são indicativos de perdas irreversíveis de DNA (Hayashi et al., 2007).

O HC não induziu aumento na formação de micronúcleos em eritrócitos de camundongo, visto que a frequência de eritrócitos micronucleados nos grupos experimental e controle negativo foram semelhantes e não revelou diferença significativa. Em relação ao controle positivo (ciclofosfamida) houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo experimental e controle negativo. De acordo com esses resultados, sugere-se que o HC não apresenta potencial clastogênico e aneugênico.

O desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas alternativas não tradicionais para a prevenção de candidose bucal é um conceito muito importante. O HC demonstrou ser um produto promissor para o tratamento de candidose bucal. Porém, mais análises devem ser realizadas, assim como a sua avaliação em estudos clínicos para verificar a segurança deste produto como fármaco.

Conclusão

O hidrogel incorporado ao citral demonstrou ter pH ácido, estabilidade quando submetido a condições extremas e boa espalhabilidade garantindo um escoamento quando aplicado na mucosa bucal. Todas as cepas de *Candida* testadas foram sensíveis ao HC. O produto inibiu significativamente o crescimento de *C.albicans* ATCC 10231 em todas as diferentes concentrações avaliadas, entre 15 a 120 minutos, quando comparada ao controle de crescimento.

O HC não induziu sinais de toxicidade aguda nos camudongos na dose única de 2000 mg/kg. O HC produziu um menor número de micronúcleos estatisticamente significativo comparado ao controle positivo (ciclofosfomida a 50 mg/kg) em eritrócitos de camudongos. O hidrogel incorporado ao citral demonstrou ser um potencial agente antifúngico contra espécies de *Candida*, com baixa toxicidade e mutagenicidade.

Referências

Barry, A., Thornsberry, C., Barry, A. (1991). Testes de suscetibilidade: procedimentos de teste de difusão - ScienceOpen. In: *Manual of clinical microbiology*. 5. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1117–1125.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004.

Cardoso, J.; Soares, M. J. (2010) *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 105(8), 1026–32.

CLSI. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS ed. Pennsylvania: [s.n.].

Damasceno, B. P., Dominici, V. A., Urbano, I. A., Silva, J. A., Araújo, I. B., Santos-Magalhães, N. S., Silva, A. K., Medeiros, A. C., Oliveira, A. G., & Egito, E. S. (2012). Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. *Journal of biomedical nanotechnology*, 8(2), 290–300. <https://doi.org/10.1166/jbn.2012.1374>

Ferreira, E., Rosalen, P. L., Benso, B., de Cássia Orlandi Sardi, J., Denny, C., Alves de Sousa, S., Queiroga Sarmiento Guerra, F., de Oliveira Lima, E., Almeida Freires, I., & Dias de Castro, R. (2021). The Use of Essential Oils and Their Isolated Compounds for the Treatment of Oral Candidiasis: A Literature Review. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2021, 1059274. <https://doi.org/10.1155/2021/1059274>

Fonseca, A. M., Fernandes, N., Ferreira, F. S., Gomes, J., & Centeno-Lima, S. (2014). Intestinal parasites in children hospitalized at the Central Hospital in Maputo, Mozambique. *Journal of infection in developing countries*, 8(6), 786–789. <https://doi.org/10.3855/jidc.3916>

Formariz, T.P. et al. (2010). Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 77(1), 47–53.

Freire, J., Júnior, J., Silva, D. F., de Sousa, J. P., Guerra, F., & de Oliveira Lima, E. (2017). Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated

from users of dental prostheses. *Evidence-based complementary and alternative medicine: eCAM*, 2017, 7158756. <https://doi.org/10.1155/2017/7158756>

Loke, C., Lee, J., Sander, S., Mei, L., & Farella, M. (2016). Factors affecting intra-oral pH - a review. *Journal of oral rehabilitation*, 43(10), 778–785. <https://doi.org/10.1111/joor.12429>

Lu, W. C. et al. (2018). Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. *Journal of Food and Drug Analysis*, 26(1), 82–89.

Miranda-Cadena, K., Marcos-Arias, C., Mateo, E., Aguirre, J. M., Quindós, G., & Eraso, E. (2018). Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. *Archives of oral biology*, 95, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2018.07.017>

Harper, R.S., et al. (2020). Acid-induced demineralisation of human enamel as a function of time and pH observed using X-ray and polarised light imaging. *Acta Biomaterialia*. 120. [10.1016/j.actbio.2020.04.045](https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.04.045).

Hayashi, M., MacGregor, J.T., Gatehouse, D.G., Blakey, D.H., Dertinger, S.D., Abramsson-Zetterberg, L., Krishna, G., Morita, T., Russo, A., Asano, N., Suzuki, H., et al. (2007). *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. *Mutation Research* 627 (2007) 10–30.

Kong, E. F., Tsui, C., Boyce, H., Ibrahim, A., Hoag, S. W., Karlsson, A. J., Meiller, T. F., & Jabra-Rizk, M. A. (2015). Development and *in vivo* evaluation of a novel histatin-5 bioadhesive hydrogel formulation against oral candidiasis. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 60(2), 881–889. <https://doi.org/10.1128/AAC.02624-15>

Leite, M.C.A. et al. (2014). Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, 1–9.

Lima, I. O., de Medeiros Nóbrega, F., de Oliveira, W. A., de Oliveira Lima, E., Albuquerque Menezes, E., Cunha, F. A., & Formiga Melo Diniz, M. (2012). Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. *Pharmaceutical biology*, 50(12), 1536–1541. <https://doi.org/10.3109/13880209.2012.694893>

Mangprayool, T., Kupittayanant, S., & Chudapongse, N. (2013). Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. *Fitoterapia*, 89, 68–73. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2013.05.012>

OECD. Guideline 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class Method.Publications - OECD. Disponível em: <<https://www.oecd.org/publications/>>. Acesso em: 20 jun. 2021.

Quindós, G., Gil-Alonso, S., Marcos-Arias, C., Sevillano, E., Mateo, E., Jauregizar,

N., & Eraso, E. (2019). Therapeutic tools for oral candidiasis: Current and new antifungal drugs. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*, 24(2), e172–e180. <https://doi.org/10.4317/medoral.22978>

Rodrigues, C. F., Rodrigues, M. E., & Henriques, M. (2019). Promising Alternative Therapeutics for Oral Candidiasis. *Current medicinal chemistry*, 26(14), 2515–2528. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180601102333>

Sakaguchi H. (2017). Treatment and prevention of oral candidiasis in elderly patients. *Medical mycology journal*, 58(2), J43–J49. <https://doi.org/10.3314/mmj.17.004>

Serra, E. et al. (2020) Methylcellulose hydrogel with *Melissa officinalis* essential oil as a potential treatment for oral candidiasis. *Microorganisms*, 8(2).

Silva, C. de B. DA et al. (2008). Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the *Brazilian Society of Infectious Diseases*, 12(1), 63–6.

Sultan, A. S. et al. (2019). Evaluation of the antifungal and wound-healing properties of a novel peptide-based bioadhesive hydrogel formulation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 63(10).

Taylor, M., Raja, A. Oral Candidiasis . [s.l.] Treasure Island, 2021.

Wathoni, N., Sari, D. P., Suharyani, I., Motoyama, K., Mohammed, A., Cahyanto, A., Abdassah, M., & Muchtaridi, M. (2020). Enhancement of α -Mangostin Wound Healing Ability by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in Hydrogel Formulation. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 13(10), 290. <https://doi.org/10.3390/ph13100290>

Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S., & Karuppayil, S. M. (2011). Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology*, 18(13), 1181–1190. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.03.008>

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Pode-se concluir de acordo com os resultados obtidos no presente estudo:

- A revisão bibliográfica revelou o efeito do citral sobre microrganismos causadores de doenças bucais, sejam isolados ou em biofilmes. Sobre a ação antifúngica foi demonstrado baixos valores de CIM em espécies de *Candida* e ação fungicida com provável mecanismo de ação sobre a membrana celular fúngica e baixa citotoxicidade;
- Os ensaios *in silico* demonstraram que o citral apresenta um amplo espectro de ação sobre microrganismos de grande importância clínica; também possui boa biodisponibilidade oral teórica e baixa toxicidade oral aguda em ratos;
- O citral apresentou potente atividade antifúngica contra cepas padrão de *C.albicans*, *C.glabrata*, *C. Krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicallis*, *C.albicans* em associação com *C.glabrata* e isolados clínicos de *C.albicans*;
- O citral apresentou atividade antifúngica frente todas as cepas estudadas e sua ação foi classificada de forma fungicida;
- O citral interferiu na cinética de crescimento da cepa padrão e clínica de *C.albicans*, revelando efeito fungicida dependendo da concentração estudada;
- O provável mecanismo de ação do citral não envolveu a parede celular de *C.albicans*;
- O citral agiu na membrana celular de *C.albicans* através de sua interação com o ergosterol presente nesta membrana;
- O HC apresentou pH ácido, boa espalhabilidade e estabilidade;
- O HC apresentou atividade antifúngica promissora contra cepas padrão de *C.albicans*, *C.glabrata*, *C. Krusei*, *C.parapsilosis*, *C.tropicallis*, *C.albicans* em associação com *C.glabrata* e isolados clínicos de *C.albicans*.
- O HC inibiu significativamente o crescimento de *C.albicans* entre 15 a 120 minutos, para as diferentes concentrações de inóculo avaliadas;
- O HC obteve baixa toxicidade aguda oral e produziu um menor número de micronúcleos estatisticamente significativo comparado ao controle positivo (ciclofosfomida a 50 mg/kg) em eritrócitos de camudongos.

- O hidrogel incorporado ao citral demonstrou ser um potencial agente antifúngico contra espécies de *Candida*, com baixa toxicidade e mutagenicidade.

REFERÊNCIAS

ADORJAN, B.; BUCHBAUER, G. Biological properties of essential oils: an updated review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 6, p. 407–426, 1 nov. 2010.

ALKHALIDI, H. M.; HOSNY, K. M.; RIZG, W. Y. Oral gel Loaded by fluconazole–sesame oil nanotransfersomes: development, optimization, and assessment of antifungal activity. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 1, p. 1–23, 1 jan. 2021.

ALMEIDA, C. M. DE et al. Antifungal, antibiofilm, and antiproliferative activities of *Guapira graciliflora* Mart. **Brazilian Oral Research**, v. 32, n. 0, 24 maio 2018.

ARENDRUP, M. C.; PATTERSON, T. F. Multidrug-resistant *candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. **The Journal of infectious diseases**, v. 216, n. suppl_3, p. S445–S451, 15 jan. 2017.

BAKKALI, F. et al. **Biological effects of essential oils - A review Food and Chemical Toxicology** Food Chem Toxicol, , fev. 2008. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17996351/>>. Acesso em: 19 jun. 2021

BARRY, A.; THORNSBERRY, C.; BARRY, A. Testes de suscetibilidade: procedimentos de teste de difusão - ScienceOpen. In: **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117–1125.

BERMAN, J.; KRYSAN, D. J. Drug resistance and tolerance in fungi. **Nature reviews. Microbiology**, v. 18, n. 6, p. 319, 1 jun. 2020.

BEYDA, N. D.; LEWIS, R. E.; GAREY, K. W. Echinocandin resistance in *Candida* species: mechanisms of reduced susceptibility and therapeutic approaches. **Annals of Pharmacotherapy**, v. 46, n. 7–8, p. 1086–1096, jul. 2012.

Brasil, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estabilidade de Produtos Cosméticos/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. -- 1. ed. -- Brasília: ANVISA, 2004.

CACCAVO, D. et al. Controlled drug release from hydrogel-based matrices: experiments and modeling. **International journal of pharmaceutics**, v. 486, n. 1–2, p. 144–152, 30 maio 2015.

CARDOSO, J.; SOARES, M. J. *In vitro* effects of citral on *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 8, p. 1026–32, dez. 2010.

CHATRATH, A. et al. *In Vitro* anti-biofilm activities of citral and thymol against *Candida tropicalis*. **Journal of Fungi**, v. 5, n. 1, p. 13, 3 fev. 2019.

CHAVES-QUIRÓS, C. et al. Assessment of cytotoxic and antimicrobial activities of two components of *Cymbopogon citratus* essential oil. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 12, n. 8, p. e749–e754, 1 ago. 2020a.

CHAVES-QUIRÓS, C. et al. Assessment of cytotoxic and antimicrobial activities of

two components of *Cymbopogon citratus* essential oil. **Journal of Clinical and Experimental Dentistry**, v. 12, n. 8, p. e749–e754, 1 ago. 2020b.

CHEVALIER, M.; RANQUE, S.; PRÊCHEUR, I. Oral fungal-bacterial biofilm models *in vitro*: a review. **Medical Mycology**, v. 56, n. 6, p. 653–667, 1 ago. 2018.

CHOUHAN, S. et al. *Candidal* Prevalence in Diabetics and its Species Identification. **International journal of applied & basic medical research**, v. 9, n. 1, p. 49–54, 2019.

CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição**. NCCLS ed. Pennsylvania: [s.n.].

COWEN, L. E.; STEINBACH, W. J. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. **Eukaryotic Cell**, v. 7, n. 5, p. 747–764, maio 2008.

CUENCA-ESTRELLA, M. **Antifungicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistencias | Manuel Cuenca Estrella**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/277261113_Antifungicos_en_el_tratamiento_de_las_infecciones_sistemicas_importancia_del_mecanismo_de_accion_espectro_de_actividad_y_resistencias>. Acesso em: 22 jul. 2019.

DAMASCENO, B. P. G. L. et al. Amphotericin B microemulsion reduces toxicity and maintains the efficacy as an antifungal product. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 8, n. 2, p. 290–300, abr. 2012.

DE OLIVEIRA, M. A. C. et al. *Cymbopogon citratus* essential oil: Effect on polymicrobial caries-related biofilm with low cytotoxicity. **Brazilian Oral Research**, v. 31, 2017.

DEORUKHKAR SC, S. S. **Non albicans Candida species: a review of epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance | S.C. Deorukhkar | Request PDF**. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/305263891_Non_albicans_Candida_species_A_review_of_epidemiology_pathogenicity_and_antifungal_resistance>. Acesso em: 22 jul. 2019.

DIAS, I. J. et al. Antifungal activity of linalool in cases of candida spp. isolated from individuals with oral candidiasis. **Brazilian Journal of Biology**, v. 78, n. 2, p. 368–374, 1 maio 2018.

ESCALANTE, A. et al. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* hauman. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 10, p. 1720–1725, 24 out. 2008.

FARAH, C.; LYNCH, N.; MCCULLOUGH, M. Oral fungal infections: an update for the general practitioner. **Australian Dental Journal**, v. 55, p. 48–54, jun. 2010.

FERREIRA, E. D. S. et al. **The use of essential oils and their isolated**

compounds for the treatment of oral candidiasis: a literature review. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, 2021. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33505486/>>. Acesso em: 4 jun. 2021

FONSECA, A. M. et al. Intestinal parasites in children hospitalized at the Central Hospital in Maputo, Mozambique. **Journal of infection in developing countries**, v. 8, n. 6, p. 786–789, jun. 2014.

FORMARIZ, T. P. et al. Structure and viscoelastic behavior of pharmaceutical biocompatible anionic microemulsions containing the antitumoral drug compound doxorubicin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 77, n. 1, p. 47–53, 1 maio 2010.

FREIRE, J. C. P. et al. Antifungal activity of essential oils against *Candida albicans* strains isolated from users of dental prostheses. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, p. 1–9, 2017.

FROST, D. J. et al. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. **The Journal of Antibiotics**, v. 48, n. 4, p. 306–310, abr. 1995.

GAO, S. et al. Antimicrobial activity of *Lemongrass essential oil (Cymbopogon flexuosus)* and its active component citral against dual-species biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Candida* species. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 603858, 22 dez. 2020.

GHANNOUM, M. A.; RICE, L. B. Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. **Clinical microbiology reviews**, v. 12, n. 4, p. 501–17, out. 1999.

HARRIS, R. Progress with superficial mycoses using essential oils. **International Journal of Aromatherapy**, v. 12, n. 2, p. 83–91, 1 jun. 2002.

Harper, Robert & Shelton, Richard & James, Jonathan & Salvati, Enrico & Besnard, Cyril & Korsunsky, Alexander & Landini, Gabriel. (2020). Acid-induced demineralisation of human enamel as a function of time and pH observed using X-ray and polarised light imaging. *Acta Biomaterialia*. 120. 10.1016/j.actbio.2020.04.045.
 HOU, L. J. et al. [Clinical characteristics analysis of 1 808 rheumatism in-patients with oral candidiasis]. **Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology**, v. 54, n. 12, p. 829–834, 2019.

HOYLE, G. E. et al. Clinical aspects of delirium. **Journal of the Royal College of Physicians of Edinburgh**, v. 38, n. 2, p. 154–157, 2008.

HU, L. et al. Characterization of oral candidiasis and the *Candida* species profile in patients with oral mucosal diseases. **Microbial pathogenesis**, v. 134, 1 set. 2019.

IOSIF, L. et al. Clinical study on thermography, as modern investigation method for *Candida*-associated denture stomatitis. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 57, n. 1, p. 191–5, 2016.

J, L.; DJ, M. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature reviews. Materials**, v. 1, n. 12, 18 out. 2016.

JAHANSHIRI, Z. et al. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: Species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 2, p. 361–366, jun. 2018.

KAUR, H.; CHAKRABARTI, A. Strategies to reduce mortality in adult and neonatal candidemia in developing countries. **Journal of fungi (Basel, Switzerland)**, v. 3, n. 3, 19 jul. 2017.

KAWASHITA, Y. et al. A retrospective study of factors associated with the development of oral candidiasis in patients receiving radiotherapy for head and neck cancer. **Medicine**, v. 97, n. 44, p. e13073, nov. 2018.

KESMEZ, Ö. et al. Oral symptoms and pathologies in Danish patients with chronic kidney disease- a pilot study. **APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, v. 128, n. 5, p. 401–405, 1 maio 2020.

KHEDRI, S. et al. Iranian HIV/AIDS patients with oropharyngeal candidiasis: identification, prevalence and antifungal susceptibility of *Candida* species. **Letters in Applied Microbiology**, v. 67, n. 4, p. 392–399, out. 2018.

KIM, M. et al. Critical evaluation of human oral bioavailability for pharmaceutical drugs by using various cheminformatics approaches. **Pharmaceutical research**, v. 31, n. 4, p. 1002, 2014.

KIRTI, Y. K. Prevalence of oral candidiasis in Indian HIV sero-positive patients with CD4+ cell count correlation. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery**, v. 71, n. 1, p. 124–127, 7 mar. 2019.

KONG, E. F. et al. Development and *in vivo* evaluation of a novel Histatin-5 bioadhesive hydrogel formulation against oral candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 881, 1 fev. 2016a.

KONG, E. F. et al. Development and *in vivo* evaluation of a novel Histatin-5 bioadhesive hydrogel formulation against oral candidiasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 2, p. 881, 1 fev. 2016b.

KURITA, N. et al. Antifungal activity of components of essential oils. <http://dx.doi.org/10.1080/00021369.1981.10864635>, v. 45, n. 4, p. 945–952, 2014.

LASKAR, A. A. et al. Citral inhibition of human salivary aldehyde dehydrogenase. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 78, n. 1, p. 31–42, 1 mar. 2020.

LAVAE, F. et al. Antifungal effect of the bark and root extracts of *Punica granatum* on oral *Candida* strains isolated from liver recipients. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 4, p. 20–24, 23 jan. 2019.

LEE, Y. et al. Antifungal Drug Resistance: Molecular Mechanisms in *Candida albicans* and Beyond. **Chemical Reviews**, v. 121, n. 6, p. 3390–3411, 24 mar. 2020.

- LEITE, M. C. A. et al. Evaluation of antifungal activity and mechanism of action of citral against *Candida albicans*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–9, 2014.
- LEWIS, M. A. O.; WILLIAMS, D. W. Diagnosis and management of oral candidosis. **British Dental Journal**, v. 223, n. 9, p. 675–681, 10 nov. 2017.
- LI, J.; MOONEY, D. J. Designing hydrogels for controlled drug delivery. **Nature Reviews Materials** 2016 1:12, v. 1, n. 12, p. 1–17, 18 out. 2016.
- LI, W. et al. Application values of clinical nursing pathway in patients with acute cerebral hemorrhage. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 11, n. 2, p. 490–494, fev. 2016.
- LIMA-SARAIVA, S. R. G. DE et al. Antioxidant activity and acute toxicity of *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 75, p. 13998–14006, 26 jan. 2016.
- LIMA, I. O. et al. Anti-*Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 1536–1541, dez. 2012a.
- LIMA, I. O. et al. Anti- *Candida albicans* effectiveness of citral and investigation of mode of action. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 12, p. 1536–1541, 2 dez. 2012b.
- LIUQING, W. et al. Effects of Essential Oil Citral on the Growth, Mycotoxin Biosynthesis and Transcriptomic Profile of *Alternaria alternata*. **Toxins**, v. 11, n. 10, 20 set. 2019.
- LOKE, C.; LEE, J.; SANDER, S.; MEI, L.; et al. Factors affecting intra-oral pH - a review. **Journal of oral rehabilitation**, v.43, n.10, p. 778–785, 2016.
<https://doi.org/10.1111/joor.12429>
- LU, W. C. et al. Preparation, characterization, and antimicrobial activity of nanoemulsions incorporating citral essential oil. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 1, p. 82–89, 1 jan. 2018.
- MANGPRAYOOL, T.; KUPITTAYANANT, S.; CHUDAPONGSE, N. Participation of citral in the bronchodilatory effect of ginger oil and possible mechanism of action. **Fitoterapia**, v. 89, p. 68–73, set. 2013.
- MARTORANO-FERNANDES, L. et al. Oral candidiasis and denture stomatitis in diabetic patients: Systematic review and meta-analysis. **Brazilian oral research**, v. 34, p. 1–18, 2020.
- MBA, I. E.; NWEZE, E. I. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. **European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology**, v. 39, n. 10, p. 1797–1819, 1 out. 2020.
- MELLO, J. C. P. DE et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**. 6. ed. [s.l.: s.n.].

MILLSOP, J. W.; FAZEL, N. Oral candidiasis. **Clinics in Dermatology**, v. 34, n. 4, p. 487–494, jul. 2016.

MIRANDA-CADENA, K. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, p. 100–107, nov. 2018a.

MIRANDA-CADENA, K. et al. Prevalence and antifungal susceptibility profiles of *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and their close-related species in oral candidiasis. **Archives of Oral Biology**, v. 95, p. 100–107, nov. 2018b.

MIRANDA-CADENA, K. et al. Development and characterization of monoolein-based liposomes of carvacrol, cinnamaldehyde, citral, or thymol with anti-candida activities. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 65, n. 4, 1 abr. 2021.

MORENO, É. M. et al. Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by Lippia alba essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide). **BMC complementary and alternative medicine**, v. 18, n. 1, p. 225, 27 jul. 2018.

MORSE, D. J. et al. Modulation of *Candida albicans* virulence in *in vitro* biofilms by oral bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 337–343, 21 abr. 2019.

OECD. **Guideline 423: Acute Oral Toxicity -Acute Toxic Class**

Method.Publications - OECD. Disponível em: <<https://www.oecd.org/publications/>>. Acesso em: 20 jun. 2021.

OLIVEIRA, V.; ET AL. Análise farmacológica e toxicológica in silico do flavonoide 5-hidroxi-4', 7-dimetoxiflavona pharmacological and toxicological analysis in silico of flavonoide 5-hydroxy-4', 7-dimetoxiflavone. **Journal of Medicine and Health Promotion**, v. 3, n. 1, p. 913–921, 2018.

PA, D. S. Health risks of herbal remedies: an update. **Clinical pharmacology and therapeutics**, v. 76, n. 1, p. 1–17, jul. 2004.

PEMÁN, J.; CANTÓN, E.; ESPINEL-INGROFF, A. Antifungal drug resistance mechanisms. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7, n. 4, p. 453–460, 10 maio 2009.

POUR, A. H.; SALARI, S.; ALMANI, P. G. N. Oropharyngeal candidiasis in HIV/AIDS patients and HIVfree subjects in the Southeast of Iran. **Current Medical Mycology**, v. 4, n. 4, p. 1–6, 23 jan. 2019.

PRASAD, R.; NAIR, R.; BANERJEE, A. Emerging Mechanisms of Drug Resistance in *Candida albicans*. **Progress in molecular and subcellular biology**, v. 58, p. 135–153, 2019.

PRISTOV, K. E.; GHANNOUM, M. A. Resistance of Candida to azoles and echinocandins worldwide. **Clinical microbiology and infection : the official publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 25, n. 7, p. 792–798, 1 jul. 2019.

- QIULI, O.; NEGGUN, T.; GUOXING, J. Transcriptional profiling analysis of *Penicillium digitatum*, the causal agent of citrus green mold, unravels an inhibited ergosterol biosynthesis pathway in response to citral. **BMC genomics**, v. 17, n. 1, 11 ago. 2016.
- QUINDOS, G. et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: current and new antifungal drugs. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, p. 0–0, 2019a.
- QUINDOS, G. et al. Therapeutic tools for oral candidiasis: current and new antifungal drugs. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 24, n. 2, p. 0–0, 1 mar. 2019b.
- RAJPUT, S. B.; KARUPPAYIL, S. M. Small molecules inhibit growth, viability and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. **SpringerPlus**, v. 2, n. 1, p. 1–6, 2013.
- REINHARDT, L. C. et al. A single-center 18-year experience with oral candidiasis in Brazil: a retrospective study of 1,534 cases. **Brazilian Oral Research**, v. 32, n. 0, p. e92, 17 set. 2018.
- RODRIGUES, C. F.; RODRIGUES, M. E.; HENRIQUES, M. C. R. Promising alternative therapeutics for oral candidiasis. **Current medicinal chemistry**, v. 26, n. 14, p. 2515–2528, 4 jun. 2019.
- SAKAGUCHI, H. Treatment and prevention of oral candidiasis in elderly patients. **Medical mycology journal**, v. 58, n. 2, p. J43–J49, 2017.
- SANGLARD, D.; ODDS, F. C. Resistance of *Candida* species to antifungal agents: molecular mechanisms and clinical consequences. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 2, n. 2, p. 73–85, fev. 2002.
- SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLÖRL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, p. 2–13, jun. 2015.
- SANTOS SBD, SABADIN CES, MÁRIO DN, RIGO L, B. DA. Oropharyngeal candidiasis in head and neck cancer patients in Iran: species identification, antifungal susceptibility and pathogenic characterization. **Um Bras Dermatol**, v. 93, n. 3, p. 356–361, jun. 2018.
- SANTOS SBD , SABADIN CES , MÁRIO DN , RIGO L, B. D. . Presence of *Candida* spp. and candidiasis in liver transplant patients. **Um Bras Dermatol**, v. 93, n. 3, p. 356–361, jun. 2018.
- SCOTTI, L. et al. Experimental methodologies and evaluations of computer-aided drug design methodologies applied to a series of 2-aminothiophene derivatives with antifungal activities. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2298–2315, 24 fev. 2012.
- SERRA, E. et al. Methylcellulose hydrogel with *Melissa officinalis* essential oil as a potential treatment for oral candidiasis. **Microorganisms**, v. 8, n. 2, 1 fev. 2020.
- SILVA, D. R. et al. *Anadenanthera Colubrina* vell brenan: anti-*Candida* and antibiofilm activities, toxicity and therapeutical action. **Brazilian Oral Research**, v.

33, n. 0, p. e023, 4 abr. 2019.

SILVA, C. DE B. DA et al. Antifungal activity of the *lemongrass* oil and citral against *Candida* spp. **The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 63–6, fev. 2008.

SOARES, M. O. et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial properties of the angolan *Cymbopogon Citratus* essential oil with a view to its utilization as food biopreservative. **Journal of Agricultural Science**, v. 5, n. 7, p. p36, 7 jun. 2013.

SOUSA, J. et al. Antifungal activity of citral by disruption of ergosterol biosynthesis in fluconazole resistant *Candida tropicalis*. **International Journal of TROPICAL DISEASE & Health**, v. 11, n. 4, p. 1–11, 10 jan. 2016.

SULTAN, A. S. et al. Evaluation of the antifungal and wound-healing properties of a novel peptide-based bioadhesive hydrogel formulation. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 63, n. 10, 2019.

TAO, N.; OUYANG, Q.; JIA, L. Citral inhibits mycelial growth of *Penicillium italicum* by a membrane damage mechanism. **Food Control**, v. 41, p. 116–121, 1 jul. 2014.

TAYLOR, M.; RAJA, A. **Oral Candidiasis** . [s.l.] Treasure Island, 2021.

TREVIÑO-RANGEL, R. DE J. et al. Association between *Candida* biofilm-forming bloodstream isolates and the clinical evolution in patients with candidemia: An observational nine-year single center study in Mexico. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 35, n. 1, p. 11–16, jan. 2018.

VASIREDDY, L.; BINGLE, L. E. H.; DAVIES, M. S. Antimicrobial activity of essential oils against multidrug-resistant clinical isolates of the burkholderia cepacia complex. **PLoS ONE**, v. 13, n. 8, 1 ago. 2018.

WALKER, L. A.; GOW, N. A. R.; MUNRO, C. A. Fungal echinocandin resistance. **Fungal Genetics and Biology**, v. 47, n. 2, p. 117–126, fev. 2010.

WANG, W.-P. et al. Effects of lipid emulsions in parenteral nutrition of esophageal cancer surgical patients receiving enteral nutrition: a comparative analysis. **Nutrients**, v. 6, n. 1, p. 111–123, dez. 2013.

WATHONI, N.; SARI, D.P.; SUHARYANI, I.; MOTOYAMA, K.; MOHAMMED, A.; et al. Enhancement of α -Mangostin Wound Healing Ability by Complexation with 2-Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin in Hydrogel Formulation. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, v.13, n.10, p. 290, 2020. <https://doi.org/10.3390/ph13100290>

WEINSTEIN, M. P. et al. **M100 Performance standards for antimicrobial susceptibility testing A CLSI supplement for global application. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing performance standards for antimicrobial susceptibility testing**. [s.l.: s.n.].

WIŃSKA, K. et al. **Essential oils as antimicrobial agents—myth or real alternative?** *Molecules* MDPI AG, , 5 jun. 2019. Disponível em:

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31195752/>>. Acesso em: 3 jun. 2021

XIA, H. et al. The *in vitro* study of apoptosis in NB4 cell induced by citral. **Cytotechnology**, v. 65, n. 1, p. 49–57, 10 jan. 2013.

YARBOROUGH, A. et al. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. **Journal of Prosthodontics**, v. 25, n. 4, p. 288–301, jun. 2016.

ZHOU, H.; TAO, N.; JIA, L. Antifungal activity of citral, octanal and α -terpineol against *Geotrichum citri-aurantii*. **Food Control**, v. 37, p. 277–283, 1 mar. 2014.

ZORE, G. B. et al. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. **Phytomedicine**, v. 18, n. 13, p. 1181–1190, 15 out. 2011.