



Universidade Estadual de Campinas
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

JANAINA PRISCILA BARBOSA

**Atividade antimicrobiana de óleos
essenciais de *Eucalyptus citriodora* e
Eucalyptus globulus contra bactérias orais e
fungos do gênero *Candida*.**

Piracicaba

2023

JANAINA PRISCILA BARBOSA

**Atividade antimicrobiana de óleos
essenciais de *Eucalyptus citriodora* e
Eucalyptus globulus contra bactérias orais e
fungos do gênero *Candida*.**

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

Orientador: Prof. Dr. José Francisco Höfling

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À
VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA
PELA ALUNA JANAINA PRISCILA
BARBOSA E ORIENTADA PELO PROF.
DR. JOSÉ FRANCISCO HÖFLING.

Piracicaba

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba
Marilene Girello - CRB 8/6159

B234a Barbosa, Janaina Priscila, 1991-
Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* contra bactérias orais e fungos do gênero *Candida* / Janaina Priscila Barbosa. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: José Francisco Höfling.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Óleos voláteis. 2. Eucalipto. 3. Biofilmes. 4. *Candida*. 5. Estreptococo. I. Höfling, José Francisco, 1947-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Antimicrobial activity of essential oils of *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus globulus* against oral bacteria and fungi of the genus *Candida*

Palavras-chave em inglês:

Oils, volatile

Eucalyptus

Biofilms

Candida

Streptococcus

Área de concentração: Microbiologia e Imunologia

Titulação: Doutora em Biologia Buco-Dental

Banca examinadora:

José Francisco Höfling [Orientador]

Vânia Sammartino Mariano

Cleide Marques Ferreira

Simone Nataly Busato de Feiria

Renata de Oliveira Mattos Graner

Data de defesa: 21-08-2023

Programa de Pós-Graduação: Biologia Buco-Dental

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0001-5356-0325>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/2596265406247549>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de Doutorado, em sessão pública realizada em 21 de agosto de 2023, considerou a candidata JANAINA PRISCILA BARBOSA aprovada.

PROF. DR. JOSÉ FRANCISCO HOFLING

PROF^a. DR^a. VÂNIA SAMMARTINO MARIANO

PROF^a. DR^a. CLEIDE MARQUES FERREIRA

PROF^a. DR^a. SIMONE NATALY BUSATO DE FEIRIA

PROF^a. DR^a. RENATA DE OLIVEIRA MATTOS GRANER

A Ata da defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

EPÍGRAFE

*“Porque Dele e por Ele, e para Ele, são todas as coisas; Glória pois,
à Ele eternamente. Amém.” (Romanos 11:36)*

*“Ele é o meu Deus, o meu refúgio, a minha fortaleza, e nele confiarei.”
(Salmo 91:2)*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À DEUS

Que tornou esse sonho possível, me dando força para continuar nos momentos difíceis.

À FAMÍLIA

Aos meus pais José e Meire, pelo incentivo e amor incondicional, por sempre acreditar que seria possível, e sem vocês nada disso seria possível.

À minha avó Magnólia por estar sempre presente em minha vida.

Às minhas irmãs Jhoannyne e Josieyne por me apoiarem e torcerem sempre.

Ao meu marido, Maycon Morato, por toda a paciência, compreensão, carinho e amor. E por dividir mais esse sonho comigo.

Ao Thor, meu filho de quatro patas, meu amor, meu companheiro de todas as horas, que enche os meus dias de alegria, e me faz uma pessoa melhor.

Ao meu sobrinho João Davi, que veio para me transbordar de amor.

À minha sobrinha Yasmin Tifani, milagre de Deus, meu maior exemplo de determinação e superação.

AO MEU ORIENTADOR

José Francisco Höfling por ter me dado esta oportunidade, pela confiança, ensinamentos e amizade.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba e Universidade Estadual de Campinas, pela excelência em ensino e pesquisa.

Ao Prof. Jacks Jorge Júnior, pela disponibilidade, paciência e pelas orientações como Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), assim como todos da equipe do CEP-FOP.

Aos Professores da área Prof^o Dr^o José Francisco Höfling, Prof^a Dr^a Renata de Oliveira Mattos- Graner, Prof^a Dr^a Marlise Inêz Klein Furlan e Prof^o Dr^o Rafael Nobrega Stipp (*in memorian*) pelo aprendizado e conhecimento transmitidos.

Aos Professores Prof^a Dr^a Renata de Oliveira Mattos-Graner, Prof^a Dr^a Cleide Marques Ferreira, Prof^a Dr^a Simone Nataly Busato de Feiria, Prof^a Dr^a Vânia Sammartino Mariano Braga por aceitarem compor a banca examinadora de defesa.

Aos Professores Prof^o Dr^o Marcelo Fabiano Gomes Boriollo, Prof^o Dr^o Jeferson Júnior da Silva e Prof^o Dr^o Rodrigo Carlos Bassi por aceitarem compor a banca examinadora suplente.

Aos Professores Prof^a Dr^a Marlise Inêz Klein Furlan, Prof^o Dr^o Renato Assis Machado, Prof^a Dr^a Josy Goldoni Lazarini por comporem a banca do exame de qualificação.

Aos Técnicos do Laboratório Valéria Defavari Franco, Anderson Laerte Teixeira, Adriano Luis Martins e Flávia Sammartino Mariano Rodrigues pelo auxílio nas atividades relacionadas ao desenvolvimento do meu trabalho.

À minha professora da graduação Roselene Canato Felipe de Oliveira, minha grande inspiração, por ter acreditado em mim e me incentivado sempre.

À minha equipe de trabalho Simone Busato de Feiria, Giovana Boni, Marcelle Buso Ramos, Paula Cristina Anibal, Daniele Puppín, Gayan Kanchana Wijesinghe, Anderson Teixeira, Thaís Rossini de Oliveira e Mariana Gomes, os meus mais sinceros agradecimentos por toda ajuda e conhecimento compartilhado.

Aos meus colegas e companheiros de laboratório Talita Graziano, Felipe Joia, Josianne Neres, Lívia Alves, Giovanny Cuya Salvatierra, Eduardo Martinelli Franco, Victor Aragão, Hassan Naved, pela amizade compartilhada.

Às grandes amigadas que foram construídas, Jeferson Júnior da Silva, Rodrigo Bassi, Filipe Matheus Cardoso, Daniele Puppín, Mateus Cardoso de Oliveira, Vanessa Bassinelo e Flávia Camila Maia, muito obrigada por deixarem meus dias mais divertidos.

À minha amiga/irmã Vanessa Cardoso, presente de Deus na minha vida, obrigada por estar sempre ao meu lado em qualquer circunstância, sua amizade foi de extrema importância nos momentos difíceis, obrigada por tudo amiga.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo nº 2018/02308-6.

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), processo nº 140989/2018-8.

Gratidão!

RESUMO

O relato de crescentes casos de resistência antimicrobiana tem impulsionado a busca de novos agentes antimicrobianos. A literatura tem demonstrado que óleos essenciais (OE) das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* apresentam efeitos antimicrobianos, como atividade antibacteriana e antifúngica. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* contra microrganismos orais, e alguns de seus fatores de virulência. As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais foram determinadas pelo método de microdiluição em caldo (CLSI, 2017; CLSI, 2018). Os efeitos dos óleos essenciais sobre as células de *Candida albicans* foi avaliado por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). A ação dos óleos contra fatores de virulência como a formação de biofilmes uniespécie e multiespécie (*C. albicans* e *S. mutans*) e a capacidade de formação de tubos germinativos foram analisados. Por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foram avaliados os danos morfológicos e estruturais dos óleos contra os biofilmes. Os possíveis efeitos citotóxicos foram determinados pela atividade antiproliferativa de células *HaCat*. Os OE apresentaram atividade antimicrobiana contra todas as espécies de microrganismos testados. A MET mostrou que os óleos essenciais foram capazes de promover danos as células de *C. albicans* em baixa concentração, como deformidades e/ou ausência da membrana citoplasmática, vacúolos no citoplasma e irregularidades de parede celular. Os óleos essenciais foram capazes de inibir a formação de tubos germinativos em até 100%. A atividade antibiofilme dos óleos essenciais foi observada contra os biofilmes testados, com redução da atividade metabólica nas concentrações testadas. O MEV demonstrou que os óleos são capazes de atuar na estrutura dos biofilmes, causando diminuição da biomassa e danos morfológicos, como murchamento celular, nas células presentes. A citotoxicidade em *HaCat* demonstrou viabilidade celular acima de 50% nas concentrações de 1 mg/mL e 0,5 mg/mL para os OE de *E. citriodora* e *E. globulus*, respectivamente. Os óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. mostraram ação antimicrobiana, antibiofilme contra *Candida* spp. e biofilmes multiespécie e apresentaram toxicidade dose-dependente.

Palavras-chave: *Eucalyptus* spp., óleo essencial, biofilme oral monoespécie e multiespécie, antifúngico, *Candida* spp, *Streptococcus* spp.

ABSTRACT

Reports of increasing cases of antimicrobial resistance have driven the search for new antimicrobial agents. The literature indicates that essential oils (EO) from the leaves of *Eucalyptus citriodora* and *Eucalyptus globulus* have antimicrobial effects, such as antibacterial and antifungal activity. The objective of this work was to evaluate the antimicrobial activity of essential oils from *E. citriodora* and *E. globulus* against oral microorganisms, and some of their virulence factors. The antimicrobial activity of essential oils was determined by the broth microdilution method (CLSI, 2017; CLSI, 2018). The effects of essential oils on *Candida albicans* cells was evaluated by Transmission Electron Microscopy (TEM). The action of the oils against virulence factors such as the formation of unispecies and multispecies biofilms (*C. albicans* and *S. mutans*) and the ability to form germ tubes were analyzed. By Scanning Electron Microscopy (SEM) the morphological and structural damages of the oils against the biofilms were evaluated. Possible cytotoxic effects were determined by the antiproliferative activity of *HaCat* cells. The EO showed antimicrobial activity against all species of microorganisms tested. TEM showed that essential oils were capable of causing damage to *C. albicans* cells at low concentrations, such as deformities and/or absence of the cytoplasmic membrane, vacuoles in the cytoplasm and cell wall irregularities. Essential oils were able to inhibit the formation of germ tubes by up to 100%. The antibiofilm activity of the essential oils was observed against the tested biofilms, with a reduction in the metabolic activity at the tested concentrations. The SEM showed that the oils are capable of acting on the structure of biofilms, causing a decrease in biomass and morphological damage, such as cellular wilting, in the cells present. Cytotoxicity in *HaCat* demonstrated cell viability above 50% at concentrations of 1 mg/mL and 0.5 mg/ml for EO from *E. citriodora* and *E. globulus*, respectively. The essential oils of *Eucalyptus* spp. showed antimicrobial action, antibiofilm against *Candida* spp. and multispecies biofilms and showed dose-dependent toxicity.

Key words: *Eucalyptus* spp., essential oil, monospecies and multispecies biofilms, antifungal, *Candida* spp., *Streptococcus* spp.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e concentração fungicida mínima (CFM). 48
- Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Streptococcus* spp. e concentração bactericida mínima (CBM). 49
- Tabela 3 - Porcentagem de tubos germinativos após o tratamento com os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* contra *C. albicans* (SC5314). 51

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

GRÁFICOS

- Gráfico 1 - Viabilidade celular (%) do biofilme em fase de adesão (90 minutos) da cepa clínica 205 (*C. albicans*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus* 53
- Gráfico 2 - Viabilidade celular (%) do biofilme em fase de adesão (90 minutos) da cepa clínica 492 (*C. dubliniensis*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*. 54
- Gráfico 3 - Viabilidade celular (%) do biofilme 24 horas da cepa clínica 205 (*C. albicans*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*. 55
- Gráfico 4 - Viabilidade celular (%) do biofilme 24 horas da cepa clínica 492 (*C. dubliniensis*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*. 55
- Gráfico 5 - Viabilidade celular (%) do biofilme de 90 minutos de *C. albicans* e *S. mutans* tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*. 56
- Gráfico 6 – Viabilidade celular (%) do biofilme de 24 horas de *C. albicans* e *S. mutans* tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*. 57
- Gráfico 7 - Viabilidade celular (%) de células *HaCat* após tratamento com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*. 64

FIGURAS

Figura 1: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células de *C. albicans* SC5314 do grupo controle e grupos de tratamentos com óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. 52

Figura 2: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme 90 minutos de *C. albicans* SC5314 após exposição aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. 58

Figura 3: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de biofilme 90 minutos de *C. albicans* SC5314 após exposição aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. 59

Figura 4: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura do biofilme de 24 horas de *Candida albicans* SC5314 e *Streptococcus mutans* UA159 após exposição aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. 61

Figura 5: Imagens representativas dos tempos de progressão do biofilme de *Candida albicans* SC5314 frente ao tratamento com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*. 63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC - *The Global Bioresource Center*

CBS - *Centraal Bureau voor Schimmelcultures*

CFM - Concentração Fungicida Mínima

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CLSI - *Clinical Laboratorial Standart Investigation*

DMSO - Dimetil sulfóxido

DNA -ácido desoxirribonucleico

eDNA- DNA extracelular

ELISA - Enzyme Linked Immunosorbent Assay

GRAM- Técnica de coloração para diferenciação de microrganismos

GRAS - *Generally Recognized As Safe*

HaCat - linhagem celular de queratinócitos normais humanos imortalizados, não transformada

h - horas

HIV - *Human Immunodeficiency Virus*

IZ - Instituto Zimotécnico-ESALQ/USP

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

mg - miligramas

mL – mililitros

nm – nanômetro

OE – Óleo essencial

PBS - Phosphate Buffered Saline

PS - Poliestireno

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

SDA - Sabouraud Dextrose Agar

SFB - Soro Fetal Bovino

SRB - Sulforrodamina B

TCA – Ácido Tricloroacético

UFC – Unidades Formadoras de Colônia

µg – microgramas

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

YND - Yeast Nitrogen Base

YPD - Yeast Peptone Dextrose

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	21
3 PROPOSIÇÃO	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	65
7 CONCLUSÃO	74
REFERÊNCIAS	75
ANEXO 1 - Certificado Comitê de Ética	88
ANEXO 2- Receita do fixador Karnovsky	89
ANEXO 3 - Receitado tampão Sorensen	90
ANEXO 4 - Preparo da solução de Tetróxido de Ósmio	91
ANEXO 5 - Receita da resina Dr Spurr	92
ANEXO 6 – Relatório de similaridade Turnitin	93

1. INTRODUÇÃO

As plantas medicinais desempenham um papel essencial na prevenção e tratamento de diversas doenças, podendo ser utilizadas para fins medicinais as plantas inteiras ou partes específicas delas (Wang *et al.*, 2020). Nas últimas três décadas, as plantas medicinais têm recebido uma importância maior devido aos inúmeros benefícios promovidos à saúde humana. Tem sido utilizada no tratamento de diversas doenças como doenças respiratórias, cardiovasculares, gastrointestinais, neurodegenerativas e reprodutivas, assim como em doenças comuns do cotidiano como distúrbios hepáticos e diabetes. O aumento significativo em pesquisas com plantas medicinais se deve a produção de metabólitos secundários, que possui extensa importância no ramo de produção de medicamentos, indústrias alimentícias, produtos farmacêuticos, entre outros (Singh & Bharadvaja, 2021).

O uso das plantas medicinais na medicina desempenha um importante papel nas necessidades básicas de saúde em países subdesenvolvidos, e tem se tornado uma base para a manutenção de saúde. Muitos dos medicamentos modernos prescritos são derivados de plantas. Pode-se notar uma crescente utilização de medicamentos à base de plantas e produtos vegetais como agentes terapêuticos nas sociedades industrializadas, sendo que cerca de três quartos da população mundial dependem de medicamentos tradicionais para suas necessidades primárias (Martins & Brijesh, 2018).

Diversos compostos vegetais têm sido testados quanto à sua atividade antimicrobiana. Os óleos essenciais, produto do metabolismo secundário das plantas aromáticas, normalmente formados em células especiais ou grupo de células, podem ser utilizados como agentes antimicrobianos no combate ou controle de doenças causadas por microrganismos, podendo substituir ou atuar como coadjuvantes de antimicrobianos sintéticos. A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser atribuída a presença de terpenóides e compostos fenólicos (Rastgou *et al.*, 2022).

O gênero *Eucalyptus* possui de aproximadamente 900 espécies, das quais mais de 300 espécies contém óleos essenciais em suas folhas. Aproximadamente 20 espécies, contém alto teor de 1,8-cineol (mais de 70% da sua composição), composto utilizado para a produção de óleos essenciais na indústria farmacêutica e cosmética.

O óleo essencial presente nas folhas de espécies de eucaliptos possui atividades biológicas, incluindo atividade antimicrobiana, antisséptica, antioxidante, quimioterápicas, tratamento de distúrbios respiratórios e gastrointestinais e cicatrizante (Dhakad *et al.*, 2018).

O aparecimento de infecções fúngicas continuam crescendo em todo o mundo, principalmente em pacientes imunocomprometidos e pacientes que fazem uso contínuo de antimicrobianos. O gênero *Candida* são as leveduras mais comumente envolvidas nesses episódios, estando relacionada a uma alta taxa de resistência aos antifúngicos e apresentando uma maior capacidade de formação de biofilmes, dificultando o tratamento dessas infecções (Cernáková *et al.*, 2019). As infecções fúngicas pelo gênero *Candida*, chamadas de Candidíase ou Candidose, pode incluir infecções mucocutâneas, visceral e sistêmicas (Ribeiro *et al.*, 2020). Foi relatado que as infecções sistêmicas por *Candida albicans* têm taxa de mortalidade de aproximadamente 40%, sendo considerada a principal espécie responsável pela candidíase sistêmica, correspondendo a 46,3% dos casos (Dadar *et al.*, 2018).

A espécie *Candida albicans* é um membro da microbiota humana como uma levedura polimórfica diploide de superfícies mucosas, geralmente encontrada nos tratos geniturinário, respiratório e gastrointestinal humano. Em geral é um fungo comensal inofensivo, podendo se tornar patógeno oportunista em pacientes imunocomprometidos ou imunologicamente deficientes. O crescimento anormal de *C. albicans* acontece devido à desequilíbrios ambientais, como a redução do pH. (Dadar *et al.*, 2018).

As infecções fúngicas por *Candida* precisam de terapia antifúngica apropriada para um melhor prognóstico. O surgimento de resistência e multirresistência desses microrganismos às classes de medicamentos disponíveis, dificulta o tratamento de pacientes. A resistência aos azóis por espécies de *Candida* é um dos maiores obstáculos para o sucesso clínico, seguido da equinocandina, além da multirresistência por algumas espécies de *Candida* (Perlim *et al.*, 2017).

O tratamento de infecções bacterianas também tem sido um desafio com o aumento da resistência aos antibióticos existente. As bactérias escapam dos efeitos dos antibióticos por diferentes mecanismos, como neutralizando os antibióticos,

bombeando-os para fora das células ou modificando sua estrutura externa, impedindo a ligação do medicamento a célula bacteriana (Breijyeh et al., 2020).

As infecções bacterianas podem acometer diversos nichos do hospedeiro, entre eles, a cavidade oral. O gênero *Streptococcus* é o primeiro gênero a colonizar a cavidade oral, produzem um arsenal de moléculas adesivas permitindo colonizar diversos tecidos orais. Possuem capacidade de metabolizar carboidratos gerando ácidos. A acidificação excessiva do ambiente oral por espécies acidúricas como o *Streptococcus mutans* está relacionada diretamente com o desenvolvimento da cárie dentária. Outra característica importante das espécies de estreptococos orais é a capacidade de gerar peróxido de hidrogênio. Em algumas situações, os estreptococos comensais e patogênicos residentes na cavidade oral podem atingir à corrente sanguínea e causar infecções sistêmicas, como endocardite infecciosa (Giannobile et al., 2011; Yoshizawa et al., 2013).

A necessidade de novas opções de antifúngicos e antibacterianos para tratamento de infecções é inegável diante do aumento significativo de casos de resistência nas últimas décadas, infecções estas que representam importante causa de morbidade e mortalidade. Estudos se concentram na descoberta de novos antifúngicos a partir de compostos químicos naturais (Fuentefria et al., 2018).

Em virtude do aumento de casos de resistência aos antimicrobianos, os estudos que buscam novos fármacos para tratamento de infecções também têm se destacado no cenário científico, e as plantas medicinais surgem como uma promissora fonte de desenvolvimento de novos fármacos. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivos: a) Avaliar a atividade antifúngica e antibacteriana dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* (adquiridos comercialmente da empresa Terra Flor) pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*, contra cepas padrão de *Streptococcus* spp.; b) Determinar a Concentração Fungicida/Bactericida Mínima (CFM/CBM) dos óleos essenciais em isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e cepas de *Streptococcus* spp.; c) Avaliar o efeito dos óleos essenciais na formação de tubo germinativo de *C. albicans*; d) Verificar o efeito dos óleos essenciais nas células planctônicas de *Candida albicans* SC5314 por Microscopia Eletrônica de Transmissão; e) Testar o efeito dos óleos essenciais sobre a fase de

adesão e sobre o biofilme de 24 horas das cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e biofilme multiespécies da cepa padrão de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*; f) Avaliar o efeito dos óleos essenciais sobre o biofilme das cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e biofilme multiespécies de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV); g) Avaliar o efeito dos óleos essenciais em biofilmes de *Candida albicans* por *time lapse* 24h, com a finalidade de entender o processo de formação do biofilme na presença dos óleos essenciais e h) Analisar possíveis efeitos citotóxicos dos óleos essenciais sobre células epiteliais humanas (*HaCat*).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A utilização de plantas medicinais como alternativa de tratamento

A medicina tradicional atualmente tem sido mais aceita do que no passado. Diversos fatores têm favorecido os estudos e investimento em tratamentos alternativos, em especial o baixo custo e a acessibilidade quando comparado à tratamentos convencionais. A Organização Mundial da Saúde (OMS) defende o uso da medicina tradicional diante da vasta literatura que demonstra a efetividade de estratégias de tratamento para diferentes doenças. (Saghafi *et al.*, 2021). A OMS também estima que aproximadamente cerca de 80% da população global dependem de medicamentos à base de plantas para o cuidado de saúde primário e também na atualização dos fitocompostos como constituintes de medicamentos para o tratamento de diversas doenças. Além da utilização dos compostos bioativos para tratamento de doenças, a medicina alternativa também tem atuado como estratégia de prevenção (Bhattacharya *et al.*, 2021). A sua utilização mantém-se principalmente em áreas rurais como resultado da transferência de conhecimentos entre gerações através da forma verbal. A falta de acesso aos serviços de saúde nessas áreas promove as estratégias de tratamento utilizando as plantas medicinais (Arjona-Garcia *et al.*, 2021). Além disso, os produtos químicos oriundos de plantas, possuem índices baixos de efeitos colaterais indesejáveis, não deixando de possuir atividades farmacológicas como antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral e muitas outras (Salehi *et al.*, 2019).

O aumento da resistência dos microrganismos à medicamentos convencionais impulsionou a procura de novas alternativas de tratamento, o que levou ao aumento de estudos e incentivos a pesquisas de novos biocompostos. Estudos mostram que compostos naturais como polifenóis, alcaloides, bem como os óleos essenciais, são promissoras fontes de tratamento contra microrganismos (Bem-Khalifa *et al.*, 2021)

2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais (OE) são um conjunto de numerosos compostos químicos que são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas. Esses compostos desempenham um importante papel de proteção às plantas, devido a sua ação antibacteriana, antifúngica, antiviral e inseticida, contribuindo para a atração de insetos polinizadores, favorecendo a dispersão de sementes e pólen. Os OE podem estar presentes em diversas partes das plantas, como por exemplo nas flores, exocarpo, folhas e casca. São também conhecidos óleos voláteis, devido a presença de substâncias voláteis à temperatura ambiente, o que confere cheiros e fragrâncias (Blásio *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais foram ganhando popularidade nos últimos anos, com o crescente interesse das indústrias alimentícia, cosmética e farmacêutica. Os consumidores também têm demonstrado maior interesse para o uso de produtos naturais como uma alternativa aos aditivos artificiais ou agentes farmacologicamente relevantes. Na área da saúde, por exemplo, profissionais como médicos, também tem se mostrado interessados às propriedades medicinais dos óleos essenciais, pois diversas pesquisas mostram que estes possuem efeitos antibacterianos, antifúngicos, relaxantes, estimuladores e até mesmo antidepressivos (Cascaes *et al.*, 2021).

Os óleos essenciais não são utilizados somente nas indústrias de perfumes, mas uma gama de óleos é aceita e reconhecida com segurança na terapêutica. Diversos estudos pré-clínicos demonstraram que muitos óleos essenciais possuem atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes e antimicrobianas em vários modelos animais e bioensaios (Korinek *et al.*, 2021). A aplicação terapêutica de óleos essenciais pode ser realizada aromáticamente, topicamente ou internamente (Abers *et al.*, 2021). A atividade antioxidante dos óleos essenciais se deve à sua capacidade de eliminar radicais livres. Devido à essa capacidade, o seu uso é apoiado na preservação de alimentos e também no controle de muitas doenças, como o câncer e doenças neurodegenerativas, cardiovasculares e do sistema imunológico (Korinek *et al.*, 2021).

Um dos possíveis direcionamentos propostos para o uso dos óleos essenciais são como potentes agentes antifúngicos. O tratamento de infecções fúngicas tem

demonstrado sérias adversidades devido ao aumento da resistência aos antifúngicos convencionais, ao qual foi ocasionado pelo uso extensivo e incorreto dos agentes antifúngicos. Essa situação impulsionou a percepção de que terapias alternativas e não convencionais são necessárias para obtenção de tratamentos antifúngicos eficazes (Rashed *et al.*, 2021). Diversos estudos demonstram que óleos essenciais de diversas plantas possuem ação antifúngica contra espécies de *Candida* spp. assim como ação antibiofilme contra a espécie de maior prevalência, *Candida albicans*. (Busato de Feiria *et al.*, 2016; Boni *et al.*, 2016; Barbosa *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2019).

Uma das atividades biológicas mais bem estabelecidas dos óleos essenciais, é a atividade antibacteriana. Estudos demonstram a atividade de óleo essencial contra várias espécies de bactérias, responsáveis por doenças nosocomiais e incluindo infecções bucais, principalmente causadas por *Streptococcus mutans*. (Moumni *et al.*, 2020). Na cavidade oral os óleos essenciais têm demonstrado propriedades antibacterianas, com benefícios promissores para a saúde oral, incluindo a redução da gengivite, halitose e controle na formação do biofilme (Benzaid *et al.*, 2021). O efeito antibacteriano dos óleos essenciais é principalmente por meio do rompimento da estrutura da membrana das células procarióticas, levando à permeabilização das células. Com o desequilíbrio da permeabilidade da membrana, todas as funções celulares, incluindo o potencial de membrana, a bomba de efluxo e a atividade respiratória tornam-se comprometidas (Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

Além de atividade contra os microrganismos, os óleos essenciais têm demonstrado atividade anticâncer, pois há uma associação direta entre a produção de espécies reativas de oxigênio e os estados oxidativos e inflamatórios que podem levar ao desenvolvimento do câncer. Está estabelecido por alguns autores que espécies reativas de oxigênio são capazes de modular as vias de sinalização mediada por redox, o que pode levar ao desenvolvimento de tumor. Medicamentos comumente utilizados para tratamento do câncer tem como objetivo principal induzir a célula tumoral à apoptose ou a parada do ciclo celular nestas células. Os OE também são capazes de induzir a apoptose das células tumorais, podendo ser um potente recurso no tratamento de câncer. Além da indução a apoptose, os óleos essenciais exercem a função de antiproliferativo em diversos modelos de células cancerígenas por meio

de vias como ativação dos sistemas de desintoxicação, reparo de DNA e inibição de metástase e angiogênese (Ahmad *et al.*, 2021; Sharifi-Rad *et al.*, 2017).

2.3 *Eucalyptus* spp.

O gênero *Eucalyptus*, popularmente conhecido como eucalipto, equivale a um dos principais gêneros da família *Myrtaceae*, nativa da Austrália e cultivada em todo mundo. O eucalipto era utilizado pelos povos indígenas para diversos fins, principalmente como fonte de remédios e alimentos. Atualmente, esta planta é utilizada na produção de madeira, celulose, combustível, controle de erosão hídrica e eólica e como fonte de óleo essencial nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos (Vecchio *et al.*, 2016).

O gênero é conhecido por ser fonte de produtos bioativos, incluindo terpenóides, taninos, flavonóides, entre outros (Gilles *et al.*, 2010; Elansary *et al.*, 2017). As folhas perenes das árvores de *Eucalyptus* spp. produzem óleos essenciais e armazenam em células secretoras. Os óleos essenciais produzidos são geralmente líquidos incolores ou amarelados, podendo em algumas espécies apresentar coloração acastanhados ou esverdeados, possuindo um odor característico. Os óleos essenciais produzidos por espécies de *Eucalyptus* são comumente abundantes em monoterpenos e alguns sesquiterpenos, sendo utilizados por indústrias farmacêuticas e perfumarias. Os óleos essenciais ricos em 1,8-cineol são amplamente utilizados nas indústrias farmacêuticas, enquanto os óleos ricos em citronelal são utilizados no ramo de perfumaria (Barbosa *et al.*, 2016).

Estudos demonstram potencial fito farmacológico dos óleos essenciais produzidos por espécies de *Eucalyptus*, possuindo propriedades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, anti-inflamatórias, antioxidantes, cicatrizantes e anti-imunomoduladoras (Salehi *et al.*, 2019). A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do gênero *Eucalyptus* foram relatadas em diversos estudos, atuando em bactérias Gram-negativas como *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, assim como em bactérias Gram-positivas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *Listeria monocytogenes* (Ait-Quazzou *et al.*, 2011). Além da atuação contra

bactérias, espécies de *Eucalyptus* atuam contra fungos do gênero *Candida*, como foi demonstrado em estudo realizado por Barbosa *et al.* (2018), atuando também contra a formação de biofilme de *Candida albicans* (Barbosa *et al.* 2019).

2.4 *Eucalyptus citriodora*

O *Eucalyptus citriodora* é um membro da família Myrtaceae, popularmente conhecido como eucalipto limão. Devido à alta concentração de cineol, citronelal e ácido citronílico em seu óleo essencial, o *E. citriodora* tem aplicação farmacológica, como analgésico, anti-inflamatório e antipirético e também em infecções do trato respiratório e congestão sinusal. Os óleos essenciais desta espécie também demonstraram possuir potentes efeitos antioxidante e inibitórios contra uma vasta gama de microrganismos, como fungos e bactérias (Ansari *et al.*, 2021). O óleo essencial de *E. citriodora* também apresenta atividade anti-helmíntica, onde foi demonstrado em estudo a capacidade de inibir cerca de 98,8% da eclosão de ovos de *Haemonchus contortus* e 99,71% do desenvolvimento da larva deste parasita (Araújo-Filho *et al.*, 2019).

A análise da composição química do óleo essencial revelou que os compostos mais abundantes são o citronelal (69,77%), citronelol (10,63%) e o isopulegol (4,66%) de um total de 22 compostos. A atividade antimicrobiana é atribuída pela presença em grande escala do citronelal (Tolba *et al.*, 2015). O citronelal também é amplamente utilizada na aromatização de produtos de limpeza, como sabões e detergentes, além de ser aplicada na produção de cosméticos. Há um extenso interesse no óleo essencial desta espécie no ramo de perfumaria, a sua procura tem se acentuado desde a sua descoberta em 1882 (Siddique *et al.*, 2013; Ali *et al.*, 2014; Barbosa *et al.*, 2016).

O aumento crescente de cepas bacterianas resistentes aos agentes terapêuticos convencionais vem impulsionando os estudos com a finalidade de desenvolvimento de novos compostos antimicrobianos, com as plantas e seus derivados têm ganhado ênfase nesses estudos. Estudo realizado com o óleo essencial de *E. citriodora* cultivado no nordeste brasileiro demonstrou possuir

propriedades antibacterianas e modificador de resistência com cepa de *Staphylococcus aureus* metilina resistente (SAMR) e contra cepas produtores de β -lactamase (Pinheiro *et al.*, 2020). A atividade antifúngica do óleo essencial também foi avaliada e demonstrada em estudo contra diversas cepas do gênero *Candida*, com a inibição das cepas em concentrações entre 0,125 mg/mL e 0,5 mg/mL (Barbosa *et al.*, 2018). A atividade antibiofilme de *Candida albicans* também foi observada em estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2019), onde atuou na inibição da formação do biofilme de *C. albicans*, apresentando baixa atividade metabólica até na concentração 1 mg/mL com 7,2% de viabilidade celular do biofilme em relação ao controle, e também demonstrou atuar em um biofilme mais estruturado (24 horas). Foi observado que na concentração de 0,5 mg/mL o biofilme apresentava apenas 14,1% de viabilidade celular em relação ao grupo controle (Barbosa *et al.*, 2019).

2.5 *Eucalyptus globulus*

O *Eucalyptus globulus* é um membro da família Myrtaceae, uma árvore perene de rápido crescimento, nativa da Austrália, atualmente cultivada em todo mundo. Os extratos da espécie *E. globulus* são tradicionalmente utilizados para tratamento de doenças como tuberculose, diarreias bacterianas, infecções respiratórias e dores articulares. Os óleos essenciais da espécie também possuem diversos efeitos biológicos, como atividade antibacteriana, antifúngicas e inseticidas, assim como ação antioxidante (Park *et al.*, 2016; Park *et al.*, 2018). As folhas de *E. globulus* são ricas em glândulas sebáceas e excelentes fontes de óleo essencial. O óleo essencial extraído das folhas tem como principal componente o eucaliptol (1,8-cineol) aproximadamente 72% da sua composição, além de compostos terpênicos, aldeídos, cetonas, álcoois livres, compostos carbonílicos, taninos, amarinas, resinas, entre outros. O óleo essencial de *E. globulus* foi colocado na categoria GRAS (Generally Regarded as Safe) pela Food and Drug Authority dos EUA e classificado como não tóxico (Sukhikh *et al.*, 2022; Alipanah *et al.*, 2022).

A atividade antimicrobiana de *E. globulus* foi demonstrada por diversos estudos presentes na literatura atual. Sukhikh e colaboradores (2022), observaram que após 12 horas de exposição ao óleo essencial de *E. globulus*, bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*) e Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*), assim como fungos do gênero *Candida* (*Candida albicans*), sofreram lise celular, demonstrando ser uma possibilidade no tratamento de infecções microbianas (Sukhikh *et al.*, 2022). Dhakad e colaboradores (2017), também observaram a promissora possibilidade do óleo essencial de *E. globulus* ser aplicado no tratamento de doenças bacterianas, inibindo o crescimento de diversos microrganismos como *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Além de inibir o desenvolvimento de bactérias, foi comprovado que o óleo essencial de *E. globulus* tem a capacidade de inibir leveduras do gênero *Candida* na sua forma planctônica, como também atuar inibindo a progressão e desestabilização de biofilmes formados por espécies de *Candida* (Dhakad *et al.*, 2017; Barbosa *et al.*, 2018; Barbosa *et al.*, 2019).

Além da atuação contra microrganismos, o óleo essencial de *E. globulus* demonstrou ser um bom candidato para tratamento de câncer. Estudos recentes também apontaram que o óleo essencial de *E. globulus* suprimiu a proliferação de células cancerígenas de cólon humano, induzindo a apoptose (Khazraei *et al.*, 2022). O óleo essencial de *E. globulus* também foi citado como um potente ativador da imunidade inata mediada por células, estimulando *in vitro* a atividade fagocítica de macrófagos derivados de monócitos humanos e neutralizando a mielotoxicidade induzida pelo quimioterápico 5-fluorouracil em ratos imunocompetentes (Zonfrillo *et al.*, 2022).

2.6 *Candida* spp. e Candidoses

Classificados como um dos maiores reinos eucarióticos, os fungos tem uma diversidade de padrões de ciclo de vida com adaptações no seu metabolismo e na morfogênese que possibilita que se adaptem às mudanças nos ecossistemas. O filo Ascomycota abrange alguns dos patógenos humanos mais bem-sucedidos, incluindo fungos virulentos que podem infectar indivíduos sem comprometimento imunológico como espécies de *Histoplasma*, *Blastomyces*, *Coccidioides* e *Paracoccidioides*, assim

como, fungos oportunistas, que causam doenças especialmente em indivíduos imunossuprimidos, como espécies *Aspergillus*, *Fusarium* e *Candida* (Lopes & Lionakis, 2021).

Candida é um fungo diplóide, frequentemente associado a infecções sistêmicas e de mucosas em humanos. Faz parte da microbiota normal de humanos e animais, podendo se tornar oportunista e causar infecções incapacitantes e letais. Fatores predisponentes à infecção por fungos do gênero *Candida* podem ser classificados em imunológicos e não imunológicos. O primeiro grupo inclui a infecção pelo HIV, com a progressão da doença, mais de 90% dos pacientes sofrem de infecções fúngicas superficiais, atingindo principalmente a orofaringe (Costa *et al.*, 2022). A espécie comumente associada à essas infecções é a *Candida albicans*. Terapias imunossupressoras, usada por exemplo em pacientes transplantados reduz a resposta imune natural, tornando o paciente mais susceptível a infecções fúngicas. Nas doenças neoplásicas o mesmo acontece, há diminuição dos mecanismos de resposta imune humoral e celular, facilitando a colonização do fungo, ocasionando infecções. E uma redução do nível de leucócitos no sangue, também é um importante fator predisponente para a infecção por *Candida* spp. No que se refere aos fatores não imunológicos pode-se mencionar distúrbios na composição quantitativa e qualitativa da microbiota, promovendo a multiplicação demasiada dos fungos. Pacientes portadores de diabetes e a taxa de glicemia descompensada quando associadas, podem promover a colonização desses microrganismos. O fluxo salivar reduzido ou atividade de neutrófilos prejudicada também são um importante fator. Outros fatores não imunológicos que podem estar associados à predisposição de infecções causadas por *Candida* estão distúrbios hormonais, dieta inadequada, tabagismo e estresse crônico (Czechowicz *et al.*, 2022; Rybak *et al.*, 2022).

As infecções causadas por *Candida* spp. podem acometer vários sítios anatômicos. Elas podem ser classificadas como infecção superficial, cutânea, mucosa e sistêmica (profunda e disseminada). As infecções superficiais podem acontecer na cavidade oral, pele, genitália, sistema respiratório e o restante do trato gastrointestinal (Mba *et al.*, 2020). Durante a infecção superficial, a interação entre células epiteliais e ligantes fúngicos levam à endocitose induzida e a penetração ativa do fungo ocasionando a infecção sistêmica (Lopes & Lionakis, 2021).

A candidíase invasiva é uma infecção grave, progressiva e potencialmente letal, podendo acometer o cérebro, o coração, ossos, olhos e outras partes do corpo. O desenvolvimento da forma grave da doença está associado a fatores de risco, como o uso de dispositivos médicos permanentes, como cateteres, internações a longo prazo, uso de antibióticos de amplo espectro. Está principalmente associada a indivíduos imunocomprometidos como pacientes com internação hospitalar prolongada, cirurgias, alterações hematológicas e doenças respiratórias (Okoye et al., 2022). Existem pelo menos 15 espécies distintas de *Candida* que causam doenças humanas, mas mais de 95% da forma invasiva são causadas por 6 principais espécies, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis*, *Candida krusei* e em algumas regiões *Candida auris*. As infecções fúngicas estão emergindo como um grande problema no âmbito da saúde, levando a altas taxa de mortalidade e altos custos médicos para governos e pacientes hospitalizados. As altas taxas de mortalidade estão atribuídas ao aumento dos episódios de infecções sistêmicas invasivas e casos de septicemia (Pristov & Ghannoum, 2019).

A patogenicidade de espécies de *Candida* spp. está associada à capacidade de transição entre a forma de levedura comensal e a forma de hifa invasiva. Quando acontece a ligação da levedura com a célula hospedeira, o tigmotropismo desencadeia a transição para a forma filamentosa, permitindo que o fungo penetre mais profundamente nos tecidos do hospedeiro através de secreção de enzimas extracelulares. Essa capacidade de transição da fase leveduriforme para filamentosa é denominada dimorfismo. Cada fase de crescimento é essencial para a virulência e patogenicidade, pois influencia como a *Candida* escapa do sistema imunológico. As formas de levedura e filamentosa desempenham papéis independentes durante a patogenicidade da *Candida*. A forma leveduriforme é importante na disseminação, enquanto a forma filamentosa está associada à invasão tecidual e na patogênese. As espécies de *Candida* também apresentam mecanismos de adaptação a condições externas, como temperatura, oxigênio, pH, disponibilidade de nutrientes, entre outras condições. A adaptação a essas condições desfavoráveis tem efeito positivo na patogenicidade e virulência de espécies de *Candida* (Mba et al., 2020).

2.6.1 Fatores de virulência da *Candida* spp.

Espécies do gênero *Candida* dispõem de um extenso arsenal de fatores de virulência que permitem sua coexistência com bactérias e resultam na colonização bem-sucedida ao hospedeiro, assim propagando a infecção (Satala *et al.*, 2021). Informações sobre o papel dos fatores de virulência de espécies de *Candida* vem sendo explorados e elucidados através de estudos *in vitro* e *in vivo*. Entre os fatores de virulência que medeiam seu êxito como patógeno estão citados, barreiras de membrana, parede celular, dimorfismo, formação de biofilmes, via de transdução de sinal, proteínas associadas à tolerância ao estresse, enzimas hidrolíticas (lipases e hemolisinas) e produção de toxinas (Staniszewska, 2020).

2.6.2 Pleomorfismo

A capacidade de transição entre as formas de levedura e hifas, é um fator importante no ciclo de vida patogênico de espécies de *Candida*, a forma filamentosa permite o fungo romper as barreiras da mucosa do hospedeiro, acessando tecidos profundos e consolidar a doença invasiva. O crescimento das hifas pelo gênero *Candida* tem relevância clínica, pois é um fator crucial na patogênese em infecções sintomáticas da mucosa assim como infecções nas sistêmicas fatais (Desai, 2018). As hifas de espécies de *Candida* invadem o tecido ativamente, usando força impulsionada por digestão enzimática do substrato ou induzindo sua própria endocitose pelas células do hospedeiro, ação mediada por enzimas líticas oriunda de vesículas exocíticas presentes nas pontas das hifas fúngicas em crescimento (Caballero-Lima *et al.*, 2013).

Em paralelo à expansão da extremidade, as hifas passam por divisão celular mitótica, sem separação das células mãe e filhas, levando a um programa transcricional que abre caminho para a regulação positiva de processos relacionados à virulência, como o aumento da aderência, invasão tecidual e formação de biofilmes (Azadmanesh *et al.*, 2017).

2.6.3 Enzimas hidrolíticas

Candida spp. depende de uma ampla gama de fatores de virulência para promover a patogenicidade em humanos. Para o sucesso na colonização e invasão tecidual, as células de *Candida* dispõem de enzimas hidrolíticas como lipases, fosfolipases e peptidases, que são secretadas pelas células fúngicas e tem papel fundamental da patogênese das espécies de *Candida*. O grupo mais versátil dessas enzimas são as endopeptidases extracelulares, pertencentes a classe das proteases aspárticas, que são responsáveis por degradar numerosos alvos proteicos no organismo hospedeiro (Silva *et al.*, 2014).

As enzimas hidrolíticas sintetizadas e secretadas por cepas de *Candida*, executam papel crucial na virulência de várias espécies, pois são fundamentais em várias etapas do processo infeccioso, contribuindo para nutrição, adesão, colonização, penetração nos tecidos e em células e promovendo escape do sistema imunológico. Proteases e lipases estão entre as classes de enzimas mais importantes sintetizadas por espécies de *Candida*, pois atuam degradando os dois principais constituintes das membranas celulares, as proteínas e fosfolípidios, induzindo a permeabilização e morte da célula do hospedeiro. As enzimas fitases possibilitam que os microrganismos adquiram fosfato e inositol do hospedeiro, e sua atividade parece contribuir para a sobrevivência e proliferação fúngica no trato gastrointestinal humano, por exemplo, onde há escassez de nutrientes. Já as hemolisinas, promovem a lise de eritrócitos, atuando na destruição de sua membrana citoplasmática, liberando seu conteúdo intracelular, e a hemoglobina liberada é utilizada pelas células de *Candida* como nutriente para promoção de seu crescimento e desenvolvimento, além disso, as hemolisinas facilitam a disseminação das espécies de *Candida* através da corrente sanguínea (Ramos *et al.*, 2014).

2.6.4 Biofilme

Os principais mecanismos de resistência planctônicos e tolerância a drogas, incluem superexpressão de bomba de efluxos após exposição a drogas, mutações genicas em genes que codificam enzimas alvo de drogas, por exemplo o gene *ERG11*,

mutações de perda de função em genes na via de biossíntese de ergosterol, ERG3 e mutações em codificantes de 1,3- β -glucana sintase. Esses mecanismos podem ser compartilhados entre cepas em estados planctônicos e de biofilmes. No entanto, sabe-se que quando as mesmas cepas planctônicas são cultivadas em comunidades de biofilmes, esses mecanismos são apenas uma porção da resistência observada nos biofilmes. Os biofilmes oferecem as espécies de *Candida* resistência adicional e mecanismos de tolerância que são únicos e específicos para estado de biofilme (Kaur *et al.*, 2023)

Os biofilmes são formados quando uma comunidade microbiana se liga irreversivelmente a um substrato que se torna incorporado a uma matriz extracelular autoproduzida. A formação de biofilme, exige uma sequência de etapas que dependem do tipo de microrganismo envolvido, mas sempre tem como início a adesão do microrganismo a uma superfície, e há vários fatores que irão influenciar na formação de biofilmes; o fluxo de fluidos que permite a troca de nutrientes, o substrato, a espécie, genes e metabólitos, são fatores que vão modular a formação de biofilmes (Paiva & Nobile, 2023).

O processo de desenvolvimento do biofilme de espécies de *Candida* podem ser divididos no geral em quatro etapas principais: adesão, proliferação, maturação e dispersão. Na fase inicial do biofilme, as células fúngicas se ligam à superfície do material, promovendo a aderência, formando uma camada basal, que irá ancorar esse biofilme à superfície. Em seguida, a fase de proliferação acontece, que é caracterizada pelo início da filamentação, surgindo as hifas e pseudo-hifas, que continuam se alongando durante o processo de desenvolvimento do biofilme, originando uma rede complexa tridimensional, que contribui para robidez do biofilme. Na fase de maturação, a rede tridimensional formada de hifas e pseudo-hifas, fica envolvida em uma matriz de substâncias exopoliméricas autoproduzidas (EPS) que atua essencialmente como uma cola adesiva mantendo toda a estrutura do biofilme agrupada. A matriz extracelular dos biofilmes de *Candida* são compostas por carboidratos, proteínas, lipídios e eDNA que interagem entre si. Na fase de dispersão acontece a liberação continuamente de células de levedura que servem para semear novos locais de infecção, garantindo que o ciclo de vida do biofilme possa ser repetido novamente. Em condições experimentais, todo o processo normalmente leva de 24 a

48 horas, e um biofilme maduro tem tipicamente centenas de micrômetros de espessura. Considera-se que essa complexidade estrutural representa o arranjo ideal para facilitar o influxo de nutrientes, a eliminação de resíduos e o estabelecimento de micronichos ao longo do biofilme (Wall *et al.*, 2023).

A resistência conferida aos biofilmes de *Candida* spp. envolve especificidade multifatorial e multiestágio, bem como mecanismos regulatórios moleculares. Os mecanismos de resistência dos biofilmes podem incluir o sequestro das drogas antifúngicas pela matriz extracelular, a expressão de genes associados à resistência, presença de células persistentes, a formação de biofilmes mistos, secreção de vesículas extracelulares, aumento da expressão de bombas de efluxos, aumento da expressão de superóxido dismutase em células persistentes protegendo-as de espécies reativas de oxigênio e produção de moléculas sinalizadoras (Wall *et al.*, 2023).

2.7 *Streptococcus* spp.

O gênero *Streptococcus* pode ser encontrado em quase todos os nichos do corpo humano, mas estão predominantemente na cavidade oral humana e no trato respiratório oral superior. Inicialmente as espécies dentro do gênero eram classificadas de acordo com o padrão de hemólise em placas de ágar sangue como β -hemólise (lise completa), α -hemólise (lise parcial) e γ -hemólise (não hemolítica) (Abranches *et al.*, 2018). Mais de 60 espécies do gênero foram reconhecidas, dentre eles, espécies de importância clínica como *S. pyogenes*, *S. agalactiae*, *S. equi*, *S. canis*, e *S. iniae*, produtores de fatores hemolíticos. Isolados pertencentes a outras espécies como *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. sanguinis*, *S. gordonii* e *S. oralis* produzem peróxido de hidrogênio (Haenni *et al.*, 2018).

A classificação das espécies de *Streptococcus* orais, foi difícil para os taxonomistas, com frequentes mudanças na sistemática refletindo na melhoria contínua de técnicas e abordagens de diferenciação de espécies e cepas. A classificação baseou-se principalmente nas propriedades bioquímicas e fisiológicas, que posteriormente foram adicionados dados genéticos (Nicolas & Lavoie, 2011).

Na cavidade oral, quando há desequilíbrio da microbiota indígena sob condições adequadas, estreptococos comensais podem transformar em patógenos oportunistas iniciando doenças bucais e causando danos ao hospedeiro. Os estreptococos orais naturalmente crescem na forma de biofilme, configurando uma coleção de inúmeras comunidades microbianas ligadas aos dentes e membranas da mucosa. O grupo dos estreptococos mutans foi descrito como o grupo mais importante relacionado à formação da cárie dentária. A espécie *Streptococcus mutans*, embora presente naturalmente na microbiota oral humana, é a espécie microbiana mais associada a lesões de cárie (Nicolas & Lavoie, 2011; Nobbs *et al.*, 2009).

A espécie *Streptococcus mutans* é conhecida como o principal agente etiológico da cárie dentária humana, residindo principalmente em biofilmes formados nas superfícies dos dentes. Além da cárie, *S. mutans* também está associado em casos de endocardite infecciosa (Lemos *et al.*, 2019). A cárie dentária é uma das doenças infecciosas associadas ao biofilme mais prevalentes, afetando a maior parte da população mundial. É causada pela disbiose do biofilme dentário aderido à superfície do esmalte. Bactérias produtoras de ácido, especialmente *S. mutans*, colonizam a superfície do dente na presença de carboidratos fermentáveis e causam danos à sua estrutura (Lin *et al.*, 2020).

O potencial cariogênico de *S. mutans* está associado a três atributos principais da espécie, a capacidade de sintetizar grandes quantidades de polímeros extracelulares de glucano a partir da sacarose, que atua auxiliando na colonização permanente de superfícies duras e no desenvolvimento da matriz polimérica extracelular; a característica acidogênica, que consiste na capacidade de transportar e metabolizar uma ampla variedade de ácidos e a capacidade de se desenvolver em pH baixo, conferindo característica acidúrica (Lemos *et al.*, 2008; Lemos *et al.*, 2019). Apesar de *S. mutans* não atuar sozinho no desenvolvimento da cárie dentária, estudos indicam que *S. mutans* pode alterar o ambiente local, formando um ambiente rico em polissacarídeos extracelulares, pH baixo, formando um nicho favorável para o desenvolvimento de outras espécies acidogênicas e acidúricas (Lemos *et al.*, 2019).

2.8 Óleos essenciais como alternativa de tratamento

O efeito alarmante que a resistência aos antimicrobianos vem causando, tem levado a comunidade científica a buscar novas estratégias para a resolução dessa problemática mundial. Uma das fontes de busca de novos agentes antimicrobianos está na medicina alternativa, as plantas e seus biocomponentes. As plantas são utilizadas há muito tempo na medicina e, devido a presença de uma gama de compostos bioativos, ricas em fitoquímicos, as plantas podem ser estruturalmente otimizadas e processadas em novas drogas antimicrobianas (Rahuman *et al.*, 2022). Considera-se, também, que geralmente compostos derivados de plantas são mais seguros quando comparados aos produtos sintéticos devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade (Shakeri *et al.*, 2018).

Sabe-se que os microrganismos em estado planctônico resistem aos agentes antimicrobianos de diversas formas, porém quando estão em biofilmes, a própria natureza estrutural dos biofilmes e as características das células presentes resultam em um ambiente que confere uma proteção maior contra condições desfavoráveis (Nourbakhsh *et al.*, 2022). As plantas medicinais já são relatadas em estudos por possuir ação contra biofilmes de diversas espécies de microrganismos, com destaque aos óleos essenciais. A ampla disponibilidade de óleos essenciais, juntamente com a baixa toxicidade aos mamíferos e a rápida degradação no ambiente torna-os promissores agentes antibiofilmes seguros. Os óleos essenciais podem atuar inibindo a formação de biofilme através de vários mecanismos (Correa *et al.*, 2019; Manju *et al.*, 2016).

Além disso, a fitoterapia é altamente lucrativa no mercado internacional, com vendas anuais alternando entre US\$ 5 bilhões na Europa Ocidental a US\$ 14 bilhões na China. Na África os produtos fitoterápicos estão disponíveis em sua maioria nos mercados urbanos e rurais (Odongo *et al.*, 2022).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo do presente estudo foi avaliar se os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* exibem atividade antimicrobiana contra leveduras do gênero *Candida* e bactérias do gênero *Streptococcus*, bem como efeito em mecanismos de virulência como biofilmes, formação de tubos germinativos e avaliar sua citotoxicidade.

Objetivos específicos do estudo:

a) Avaliar as atividades antifúngica e antibacteriana dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* (adquiridos comercialmente da empresa *Terra Flor*) pela determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) em isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e cepas padrão de espécies de *Streptococcus* spp;

b) Determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos óleos essenciais em isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*; e determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) de espécies de *Streptococcus* spp;

c) Verificar o efeito dos óleos essenciais nas células planctônicas de *Candida albicans* SC5314 por Microscopia Eletrônica de Transmissão;

d) Avaliar o efeito dos óleos essenciais na formação de tubo germinativo de *C. albicans* SC5314;

e) Testar o efeito dos óleos essenciais sobre biofilmes na fase de adesão (90 minutos) e em formação (24 horas) das cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e do biofilme multiespécie *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*;

f) Verificar o efeito dos óleos essenciais sobre os biofilmes das cepas clínicas de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e do biofilme multiespécie de *Candida albicans* SC5314 e *Streptococcus mutans* UA159 por Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV);

g) Avaliar o efeito dos óleos essenciais em biofilmes de *Candida albicans* por time *lapse* 24h, com a finalidade de avaliar o processo de formação do biofilme na presença dos óleos essenciais;

h) Avaliar possíveis efeitos citotóxicos dos óleos essenciais sobre células epiteliais humanas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*, foram adquiridos comercialmente da empresa TERRA FLOR.

- *Eucalyptus citriodora* (Lote: C064/16)
- *Eucalyptus globulus* (Lote: L173)

4.2 Amostras de Leveduras

Cepa de referência: *Candida albicans* (ATCC SC5314) – (ATCC - *The Global Bioresource Center*).

Isolados clínicos: Isolados clínicos de cavidade bucal e prótese oral: *Candida albicans* (370), *Candida albicans* (163), *Candida albicans* (196), *Candida albicans* (524), *Candida albicans* (611), *Candida albicans* (192), *Candida albicans* (326), *Candida albicans* (205), *Candida dubliniensis* (311), *Candida dubliniensis* (248), *Candida dubliniensis* (492). Cepas provenientes da cavidade bucal e/ou próteses dentárias de pacientes, adultos, capazes, portadores de prótese bucal, que receberam atendimento odontológico na Clínica de Prótese da Faculdade de Odontologia de Alfenas, da Universidade de Alfenas, gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Marcelo Fabiano Gomes Boriollo (Projeto aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa – Faculdade de Odontologia de Piracicaba/ CAE: 79399017.0.0000.5418)

4.3 Amostras de *Streptococcus* spp.

Cepas de *Streptococcus* orais: *Streptococcus gordonii* Challis; *Streptococcus mitis* NCTC 12261; *Streptococcus mutans* UA159; *Streptococcus sanguinis* SK36; *Streptococcus salivarius* ATCC 7073; *Streptococcus oralis* ATCC

10557 (Coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da FOP/UNICAMP);

4.4 Diluição dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* foram diluídos em solução Tween 80 (0,025%), solução DMSO (0,5%) e meio de cultura. O antifúngico Fluconazol foi diluído em DMSO.

4.5 Atividade antifúngica dos óleos essenciais

4.5.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *Candida* spp.

Os óleos essenciais foram testados quanto a sua atividade antifúngica, determinando-se a concentração inibitória mínima dos óleos contra diferentes cepas de *Candida* spp. pela técnica de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do protocolo M27-A3 (CLSI, 2017).

O ajuste do inóculo foi feito em solução salina (NaCl 0,9%), equivalente a $5,0 \times 10^6$ UFC/mL em espectrofotômetro (0,08 – 0,1 abs, 530 nm). O inóculo foi padronizado a $2,5 \times 10^3$ por diluição seriada.

Em uma microplaca estéril de 96 poços foram distribuídos 100 µl de RPMI em todos os poços, adicionando-se a primeira coluna 100 µl do óleo essencial na concentração inicial de 16 mg/mL, procedendo-se a microdiluição seriada dos óleos essenciais. Após o processo de diluição seriada foram adicionados 100 µl do inóculo ajustado, originando os seguintes grupos:

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

- Grupo controle positivo 2: meio de cultura, diluente e inóculo, com a finalidade de observar possíveis efeitos tóxicos do diluente para a levedura;
- Grupo controle negativo 1: somente meio de cultura, para observação de possíveis contaminações;
- Grupo controle negativo 2: meio de cultura, óleo essencial e diluente, finalidade de observar possíveis contaminações no processo de microdiluição;
- Grupo teste: óleo essencial de *E. citriodora* ou *E. globulus* (Concentrações testadas – 16 a 0,0156 mg/mL), meio de cultura e inóculo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C em estufa de aerobiose, e posteriormente foi feita leitura visual (M27-A3 - CLSI, 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata por três ensaios independentes.

4.5.2 Determinação da Concentração fungicida mínima – CFM

Após a leitura visual da CIM, os poços da placa foram homogeneizados por pipetagem, e uma alíquota de 10 µl de cada poço foi transferida para a placa de Petri contendo Ágar Sabouraud Dextrose - SDA (KASVI). Após incubação da placa de Petri a 37°C por 48h, foi estabelecida a menor concentração fungicida. A CFM foi determinada como a menor concentração dos óleos essenciais, que não permite o crescimento de qualquer colônia do fungo na cultura sólida por leitura visual, assim caracterizando os efeitos fungicida e fungistático dos óleos essenciais testados (GULLO *et al.*, 2012). Os ensaios foram realizados em triplicata e três ensaios independentes.

4.6 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.

4.6.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM) de *Streptococcus* spp.

Os óleos essenciais foram testados quanto a sua atividade antibacteriana, determinando-se a concentração inibitória mínima dos óleos contra diferentes cepas

de *Streptococcus* spp. pela técnica de microdiluição em caldo seguindo as recomendações do protocolo M07-A10 (CLSI, 2015).

O inóculo foi ajustado em solução salina, tendo a turbidez correspondente a 0,5 na escala Mc Farland, a uma absorbância de 0,08 a 0,13 à 530nm no espectrofotômetro, a concentração final de células na placa foi de 1×10^8 UFC/mL.

Em uma microplaca estéril de 96 poços foram distribuídos 100 µl de caldo Mueller Hinton (MH) em todos os poços, adicionado a primeira coluna 100 µl do óleo essencial na concentração inicial de 16 mg/mL, e então procedeu-se a microdiluição seriada dos óleos essenciais. Após o processo de diluição seriada foram adicionados 100 µl do inóculo ajustado, originando os seguintes grupos:

- Grupo controle positivo 1: meio de cultura e inóculo, para observação do crescimento bacteriano;
- Grupo controle positivo 2: meio de cultura, diluente e inóculo, com a finalidade de observar possíveis efeitos tóxicos do diluente para as bactérias;
- Grupo controle negativo 1: somente meio de cultura, para observação de possíveis contaminações;
- Grupo controle negativo 2: meio de cultura, óleo essencial e diluente, com a finalidade de observar possíveis contaminações no processo de microdiluição;
- Grupo teste: óleo essencial de *E. citriodora* ou *E. globulus* (Concentrações testadas – 16 a 0,0156 mg/mL), meio de cultura e inóculo. As placas foram incubadas por 24 horas a 37° C, e 10% CO₂, e posteriormente foi feita leitura visual (M07-A10 - CLSI, 2015). Os ensaios foram realizados em triplicata e três ensaios independentes.

4.6.2 Determinação da Concentração bactericida mínima – CBM

Para a determinação da concentração bactericida mínima (CBM), alíquotas de 10 µL do tratamento do ensaio de concentração inibitória mínima, ou seja, dos compartimentos da placa foram plaqueadas em meio de cultura sólido BHI (Brain Heart Infusion) ágar, posteriormente incubadas por 24h, à 37°C e 10% CO₂, para

determinação das Unidades Formadoras de Colônias (UFC). A CBM foi determinada como a menor concentração dos óleos essenciais, que não permite o crescimento de qualquer colônia das bactérias na cultura sólida por leitura visual, assim caracterizando os efeitos bactericida e bacteriostático dos óleos essenciais testados (GULLO *et al.*, 2012). Os ensaios foram realizados em triplicata por três ensaios independentes.

4.7 Análise do efeito dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* na formação de tubo germinativo de *C. albicans* (SC5314)

A cepa de *Candida albicans* SC5314 foi incubada em YPD com agitação de 100 rpm à 35°C overnight. Após a incubação o inóculo foi centrifugado e lavado com PBS 1x (3 min em 9.000 rpm), este processo foi repetido por 2x e depois ressuspenso em PBS. O ajuste do inóculo foi realizado em espectrofotômetro em escala de 1.0 Mc Farland, equivalente à 0,16 a 2,0 abs em 530 nm. O inóculo ajustado foi diluído em soro fetal bovino (SFB) (1:10); e as soluções de tratamento dos óleos essenciais foram preparadas em SFB. Os grupos testes foram preparados com as soluções de tratamento do OE + inóculo diluído (1:1). O grupo controle foi preparado com o inóculo diluído + soro fetal bovino (1:1) Foi retirado uma alíquota de cada grupo teste e do controle e foi realizado contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico em aumento de 400x. Contagens subsequentes foram feitas nos períodos de 1h, 2h, 3h e 4h. Os dados obtidos nas contagens foram transformados em porcentagens (Hammer *et al.*, 2000)

4.8 Análise do efeito dos óleos essenciais sobre a célula de *Candida albicans* por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

Com a finalidade de avaliar o efeito dos óleos essenciais na morfologia celular de *Candida albicans*, foi escolhida a metodologia de MET, que permite a visualização dos possíveis danos que os óleos essenciais podem causar as leveduras. Após o crescimento overnight em SDA de *C. albicans* SC5314, as células foram ajustadas a

1×10^6 UFC/mL e foram incubadas juntamente com os óleos essenciais nas concentrações subCIM, após 24 horas de incubação, a amostra foi centrifugada por 6 minutos a 13.000 rpm (centrífuga *ependorf*) para a formação de *pellet*. Os pellets foram ressuspensos em fixador Karnovsky (anexo 2) e incubados por 36 horas. Após o período de fixação, a amostra foi lavada com solução salina 0,9% para remoção do fixador, centrifugada e lavada com tampão fosfato de Sorensen 0,1M (anexo 3). Em seguida, tratadas com tetróxido de ósmio 1% (anexo 4) por 4 horas, seguido de 3 lavagens de 5 minutos de tampão Sorensen 0,1M, desidratadas com Acetona (Merck) 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, com 5 minutos cada, e então, as amostras foram incluídas gradativamente em resina Dr Spurr (anexo 5) até a inclusão em resina pura e a secagem foi realizada em estufa 60-70°C (FANEM). Após esse período as amostras foram cortadas em ultramicrótomo, contrastadas com chumbo e uranila e analisadas em microscópio eletrônico de transmissão, JEM 1400 JEOL (Roque *et al.*, 2015).

4.9 Efeito dos óleos essenciais sobre biofilme de isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis*.

Ajuste do inóculo: A cultura foi incubada *overnight* em YPD a 30°C sob agitação de 180 rpm. Uma alíquota de 7 mL do inóculo foi centrifugada a 3.000 rpm por 5 min. e lavada 2x com PBS para retirada do meio de cultura. Após a última centrifugação a 3.000 rpm por 5 min foi descartado o sobrenadante e o *pellet* foi ressuspenso em 7 mL de YNB. Da suspensão celular resultante foi preparada uma diluição de 1:100, para contagem celular em Câmara de Neubauer por microscopia óptica (aumento de 400x). Após a contagem e cálculo, o inóculo foi ajustado a $1,0 \times 10^6$ células/mL, em YNB. (Pierce *et al.*, 2008):

Biofilme 90 minutos: na microplaca estéril de 96 poços tipo PS (fundo U) foram depositados 100 µl de inóculo, o qual foi incubado por 90 minutos sob agitação (100 rpm a 37°C) em incubador de microplaca. Em seguida, a placa foi lavada 3x com PBS e adicionado 100 µl do óleo essencial diluído nas concentrações a serem testada (64 mg/mL a 0,125 mg/mL). A placa contendo o inóculo e óleo foi incubada por 24h a 37°C em estufa de aerobiose (Silva *et al.*, 2010).

Biofilme 24 horas: na microplaca de 96 poços com fundo U foram depositados 100 µl de inóculo, o qual foi incubado por 24h sob agitação (100 rpm a 37°C) em incubador de microplaca. Posteriormente, a placa foi lavada 3x com PBS e foram adicionados 100 µl do óleo essencial diluído nas concentrações a serem testadas (64 mg/mL a 0,125 mg/mL). A placa foi incubada por 24h a 37°C em estufa de aerobiose (Pierce *et al.*, 2008). Os ensaios foram realizados em triplicata por três ensaios independentes.

4.9.1 Análise da viabilidade celular dos biofilmes

Para a análise da viabilidade celular do biofilme, as placas foram previamente lavadas 3x com PBS e, posteriormente coradas com 80 µL de XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil) -2 H -tetrazolium-5-carboxanilida] durante 2 horas. A seguir, o biofilme foi mensurado (A490nm) em leitor de microplacas ELISA (Versa MAX, molecular Devices, EUA). Os valores de absorbância foram subtraídos dos valores de absorbância do controle de modo a avaliar a quantidade de biofilme (Pierce *et al.*, 2008).

4.10 Efeito dos óleos essenciais sobre biofilme de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans*.

Para o desenvolvimento desse ensaio foram produzidos biofilmes de espécies de *Candida albicans* SC5314 e *Streptococcus mutans* UA159 em microplacas de 96 poços PS (Global Trade), sendo colocados 100 µL de cada suspensão de inóculo a 2×10^7 células/mL de *C. albicans* e 2×10^8 células/mL de *S. mutans*. As placas foram incubadas a 10% de CO₂ e 37°C durante 90 min para promover a adesão celular. Em seguida, o meio de cultura foi aspirado, e a placa lavada (1x) com PBS 1x, a fim de remover células não aderentes. Em seguida foram adicionados 200 µL dos óleos essenciais diluídos no meio de cultura TSB (Tryptic Soy Broth), na concentração inicial de 64 mg/mL e a placa foi novamente incubada por 24h à 37°C em 10% de CO₂ (Fernandes *et al.*, 2016).

4.10.1 Análise da viabilidade celular do Biofilme misto por XTT

Para a análise da viabilidade celular do biofilme, foi utilizado o ensaio de redução do XTT [2,3-bis(2-metoxi-4-nitro-5-sulfo-fenil)-2H-tetrazolium-5-carboxanilida]. As placas foram previamente lavadas 3x com PBS e posteriormente coradas com 200 µL de XTT durante 3 horas em estufa à 37°C com agitação de 120rpm, protegido da luz. A seguir, o biofilme foi mensurado (A490nm) em leitor de microplacas ELISA (Versa MAX, molecular Devices, EUA). Os valores de absorbância foram subtraídos dos valores do controle a fim de avaliar a quantidade de biofilme (Fernandes *et al.*, 2016).

4.11 Análise dos biofilmes monoespécie *Candida albicans* SC5314 e biofilme multiespécie de *Candida albicans* SC5314 e *Streptococcus mutans* UA159 por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) sobre reembasamento de prótese dentária.

Para análise do efeito dos óleos essenciais no biofilme monoespécie de *Candida albicans* (SC5314) e biofilme multiespécie de *Candida albicans* (SC5314) e *Streptococcus mutans* (UA159) por MEV, o inóculo foi ajustado igualmente ao descrito anteriormente no ensaio de biofilme (item 2.9 e 2.10). A partir da suspensão celular final, os biofilmes foram produzidos em corpos de prova. Para o ensaio de biofilme de 90 minutos de *C. albicans*, as células foram incubadas sob agitação por 100 rpm em agitador de microplacas a 37° C por 90 min. e, posteriormente foram adicionados os óleos essenciais na concentração de 2 mg/mL para o óleo essencial de *E. citriodora* na concentração de 8 mg/mL para o óleo essencial de *E. globulus* incubando-se em estufa de aerobiose a 37° C por 24 horas. Para o biofilme 24 horas, a suspensão celular foi incubada a 37° C por 24 horas em estufa de aerobiose para o biofilme monoespécies e estufa 10% CO₂ para o biofilme multiespécie; após o período de incubação, foi adicionado o óleo essencial de *E. citriodora* nas concentrações de 2 mg/mL para o biofilme monoespécie e 8 mg/mL para o multiespécie. O óleo essencial

de *E. globulus* foi adicionado na concentração de 8 mg/ml para ambos os biofilmes. Após a adição do tratamento, as placas foram novamente incubadas por mais 24 horas. Após o período de incubação foi retirado o meio de cultura e os biofilmes fixados com glutaraldeído (2,0%) por 30 minutos, seguidos de secagem em temperatura ambiente. Os espécimes foram desidratados em banhos com concentrações crescentes de etanol (50%, 70%, 90% e 100%) por 10 minutos. Espécimes foram secos, metalizados e armazenados em dessecador para subsequente observação em MEV (JEOL, JSM 5600LV, Japão). Ao controle foram adicionados apenas amostras de microrganismos sem a presença dos óleos essenciais.

4.12 Análise do processo de formação do biofilme de *Candida albicans* (SC5314) por Microscopia equipada com *Time-lapse*.

O biofilme foi formado de acordo com o item 4.9 e a progressão do biofilme de *C. albicans* (SC5314) foi observada desde o tempo 0 até 24h de tratamento, tanto da parte superior como lateral por imagens de *Time-lapse*, microscópio equipado com Câmera Digital com sistema para captura de imagens, por 24 h a uma taxa de 1 imagem/min, com a finalidade de avaliar o processo de formação do biofilme na presença dos óleos essenciais.

4.13 Avaliação da Atividade antiproliferativa de células *HaCat*

As células epiteliais *HaCat*, utilizadas para este estudo, provêm da linhagem celular de queratinócitos humanos imortalizados, mas não transformada. As células foram reativadas de estoque, mantidas à -80°C, ressuspensas em RPMI completo, suplementado com aminoácidos não essenciais, antimicrobianos e 10% de SFB (soro Fetal Bovino). As células foram cultivadas até 80% de confluência da garrafa, tripsinizadas e ajustadas à 5×10^4 cels/mL. Um volume de 100 μ L da suspensão celular foi transferida para placa de 96 poços, incubadas por 24 horas à 5% CO² em estufa de cultura celular e, posteriormente, tratadas com óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* em concentrações decrescentes ([] inicial de 64 mg/mL).

Após 24 horas de incubação, as células foram fixadas com 50 µL/compartimento de Ácido Tricloroacético (TCA) 50% por 1h à 4°C, lavadas com água destilada (4x), secas a temperatura ambiente e posteriormente coradas com SRB 4% em ácido acético, 50 µL/compartimento por 1 hora à 4°C, em seguida, as placas foram lavadas com ácido acético 1% (4x) e secas em temperatura ambiente. Para a solubilização do corante, foram adicionados 100 µL de Trizma Base, 10 µM e pH 10,5 e a absorbância lida à 540nm em espectrofotômetro de microplacas (Versa MAX, molecular Devices, EUA). As análises dos dados de absorbância foram feitas seguindo o parâmetro IC50, como descrito previamente por Endo *et al.* (2010).

4.14 Análise estatística

Para as avaliações comparativas foi utilizada a análise estatística ANOVA, variação *Dunnnett*, bilateral ($P < 0,05$), (Programa Biostat 5.0).

5. RESULTADOS

5.1 Avaliação da atividade antifúngica e concentração fungicida mínima

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* foram testados contra cepas de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* provenientes de isolados clínicos de prótese dentária, com a finalidade de determinar seu efeito inibitório pela técnica de microdiluição em caldo. Ambos os óleos testados apresentaram atividade inibitória sobre cepas testadas (Tabela 1). Após a determinação dos valores da CIM dos óleos essenciais, uma alíquota do ensaio de susceptibilidade foi utilizada para determinar a Concentração Fungicida Mínima (CFM) contra as cepas de *Candida* spp. O antifúngico Fluconazol foi usado como controle.

Tabela 1. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e concentração fungicida mínima (CFM).

	<i>E. citriodora</i>		<i>E. globulus</i>		Fluconazol CIM
	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	
1 (ca 524)	0.25	0.5	1	1	0.001
2 (ca 163)	0.25	0.5	1	1	0.001
3 (ca 205)	0.125	0.125	1	1	0.001
4 (ca 192)	0.5	0.5	1	1	0.002
5 (ca 196)	0.125	0.125	1	1	0.001
6 (ca 370)	0.25	0.5	1	1	0.001
7 (ca 326)	0.25	0.5	2	2	0.002
8 (ca 611)	0.25	0.25	1	2	0.002
9 (cd 311)	0.25	0.25	1	2	0.001
10 (cd 492)	0.25	0.25	1	2	0.002
11 (cd 248)	0.25	0.5	1	1	0.002

CIM: Concentração inibitória mínima; CFM: Concentração fungicida mínima; ca: *Candida albicans*; cd: *Candida dubliniensis*

As cepas testadas foram sensíveis aos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*. As concentrações inibitórias mínimas variaram entre 0,125 à 0,5 mg/mL para o óleo de *E. citriodora* e entre 1 e 2 mg/mL para *E. globulus*. A cepa 192 *Candida*

albicans apresentou uma maior resistência comparada as demais cepas testadas na presença do OE de *E. citriodora*, enquanto na presença de *E. globulus* a cepa 326 *Candida albicans* foi a cepa que apresentou maior resistência. As cepas isoladas de prótese *C. albicans* (205) e *C. dubliniensis* (492), escolhida para os demais testes desse trabalho, apresentaram CIM de 0,125 e 0,250 mg/mL, respectivamente para o OE de *E. citriodora*, enquanto para o OE de *E. globulus* a CIM foi de 1 mg/ml para ambas as cepas.

5.2 Avaliação da atividade antibacteriana e concentração bactericida mínima

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* foram testados contra cepas de padrão do gênero *Streptococcus*, para determinar seu efeito inibitório pela técnica de microdiluição em caldo. Ambos os óleos testados apresentaram atividade inibitória sobre cepas bacterianas testadas (Tabela 2). Após a determinação dos valores da CIM dos óleos essenciais, uma alíquota do ensaio de susceptibilidade foi utilizada para determinar a concentração bactericida mínima (CBM) contra as cepas de *Streptococcus* spp.

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais de *Streptococcus* spp. e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

	<i>E. citriodora</i>		<i>E. globulus</i>		Clorexidina CIM (mg/mL)
	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CFM (mg/mL)	
<i>S. mutans</i>	2	2	16	16	0.0035
<i>S. mitis</i>	2	2	16	16	0.0035
<i>S. oralis</i>	2	2	4	4	0.015
<i>S. gordonii</i>	2	2	8	8	0.0075
<i>S. salivarius</i>	1	1	8	8	0.0035
<i>S. sanguinis</i>	2	2	8	8	0.0075

CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Concentração bactericida mínima

Todos os óleos essenciais testados apresentaram atividade antimicrobiana. As concentrações inibitórias mínima variaram entre 1 e 2 mg/mL para o óleo de *E. citriodora* e entre 16 à 4 mg/mL para *E. globulus*, demonstrando o óleo de *E. citriodora* foi mais eficaz comparado ao óleo da espécie *E. globulus* para estas cepas.

As cepas de *S. mutans* e *S. mitis* apresentaram uma maior resistência comparada as demais cepas testadas na presença do OE de *E. globulus*, enquanto na presença de *E. citriodora* os resultados entre as cepas foram similares, apenas a cepa *S. salivarius* foi capaz de ser inibida em uma concentração menor. Ambos os óleos essenciais demonstram perfil bactericida, onde a concentração capaz de inibir o crescimento bacteriana é a mesma capaz de matar a cepa. Esses dados demonstram que os óleos essenciais são efetivos contra todas as cepas bacterianas testadas.

5.3 Análise do efeito dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* na formação de tubo germinativo de *C. albicans* (SC5314)

Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* foram testados no controle da progressão do tubo germinativo de *C. albicans*. Foi observado na leitura da primeira alíquota, no tempo 0, um crescimento uniforme entre o controle e as concentrações testadas, onde as células em sua grande maioria se apresentavam no formato de blastoconídeo. Após 1h de incubação foi realizado a segunda leitura, o perfil de crescimento já havia se modificado, o controle apresentava 50% das células presentes no formato de hifas, os tratamentos apresentavam hifas em uma quantidade bem menor, o tratamento com óleo essencial de *E. globulus* na concentração de 4 mg/ml foi capaz de inibir 100% a formação de hifas já no período de 1h. A partir de 2h de incubação, o controle apresentava 100% das células em formato de hifas, enquanto os tratamentos seguiram inibindo a formação das hifas, o tratamento que se mostrou mais eficaz foi o óleo essencial de *E. globulus* na concentração de 4 mg/ml, foi capaz de inibir 100% a formação de hifas em todas as leituras, seguido do tratamento com óleo essencial de *E. citriodora* na

concentração de 0,5 mg/ml, onde após a terceira hora de tratamento foi capaz de inibir 100% a formação de hifas pela cepa de *C. albicans* testada (Tabela 3).

Tabela 3 - Presença de tubos germinativos de *C. albicans* (SC5314) após o tratamento com os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus*.

Tratamento	Presença de tubo germinativo (%)				
	0h	1h	2h	3h	4h
<i>E. citriodora</i> 0,250mg/ml + Ca + SFB	0	3,3	0	12,5	5,7
<i>E. citriodora</i> 0,5mg/ml + Ca + SFB	0	10	5,9	0	0
<i>E. globulus</i> 2 mg/ml + Ca + SFB	2,7	5	4,2	4,3	0
<i>E. globulus</i> 4 mg/ml + Ca + SFB	0	0	0	0	0
Controle (Ca + SFB)	1,6	50	100	100	100

Ca: *Candida albicans* (SC5314); SFB: Soro Fetal Bovino

5.4 Análise da ação dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).

As células de *C. albicans* foram tratadas com concentrações subCIM de óleos essenciais de *E. citriodora* (0,125 mg/mL) e *E. globulus* (0,5 mg/mL). Foram adicionados ao experimento o grupo controle, sem adição de óleos essenciais. Foi observado que o grupo controle exibiu membrana plasmática intacta, parede celular íntegra uniforme e citoplasma da célula complexo e com organelas (Imagem A, B e C). O grupo de tratamento com óleo essencial de *E. citriodora* demonstrou deformidades na membrana plasmática, invaginação de membrana, estruturas enoveladas no citoplasma celular, semelhança da membrana ou pedaços da mesma, somado, presença de vacúolos no citoplasma e afinamento da parede celular (Imagem D, E e F). Nos tratamentos com óleo essencial de *E. globulus*, além das deformidades encontradas com o tratamento de *E. citriodora* ainda foi observado muitas células deformadas, com a morfologia disforme, ausência de membrana citoplasmática, além de vacúolos no citoplasma como mostradas nas imagens G, H e I da Figura 1.

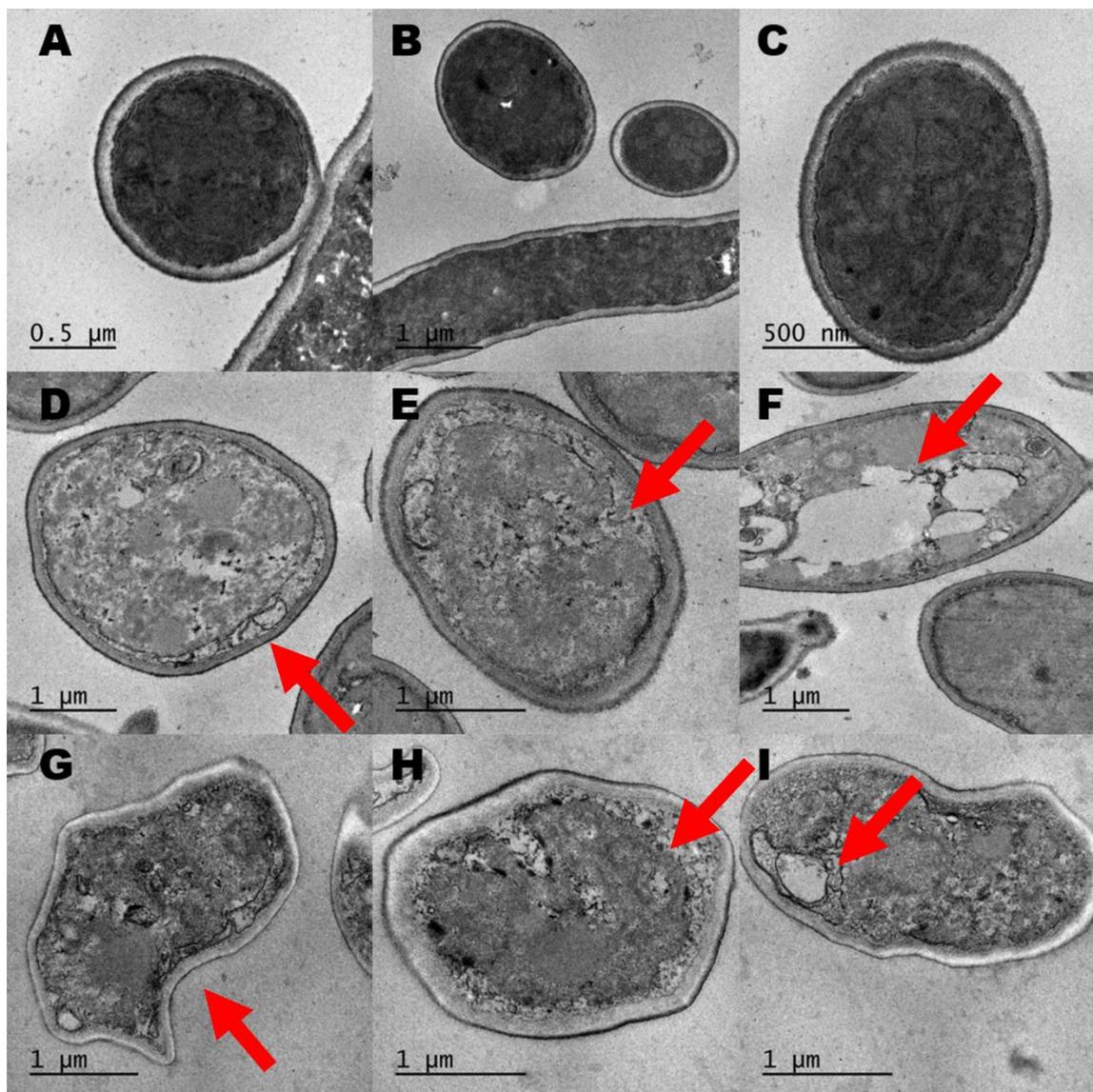


Figura 1: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) de células de *C. albicans* SC5314 do grupo controle e grupos de tratamentos com óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. A, B e C: Controle de *C. albicans*, sem tratamento. D, E e F: Tratamento com *E. citriodora*; G, H e I: Tratamento com *E. globulus*.

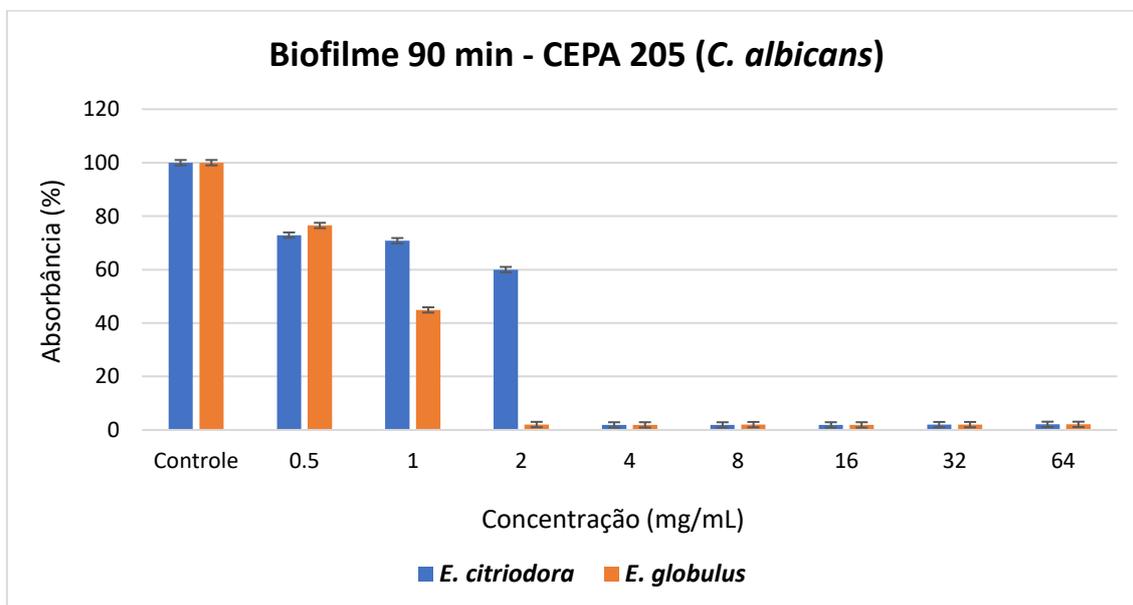
5.5 Avaliação da ação dos óleos essenciais sobre biofilmes de *C. albicans* e *C. dubliniensis*

Os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* foram testados em diferentes concentrações contra os biofilmes em fase de adesão (90 minutos) e intermediário (24 horas) de *Candida albicans* (cepa clínica 205) e *Candida dubliniensis*

(cepa clínica 492), com o objetivo de avaliar o efeito dos óleos pela viabilidade celular dos biofilmes.

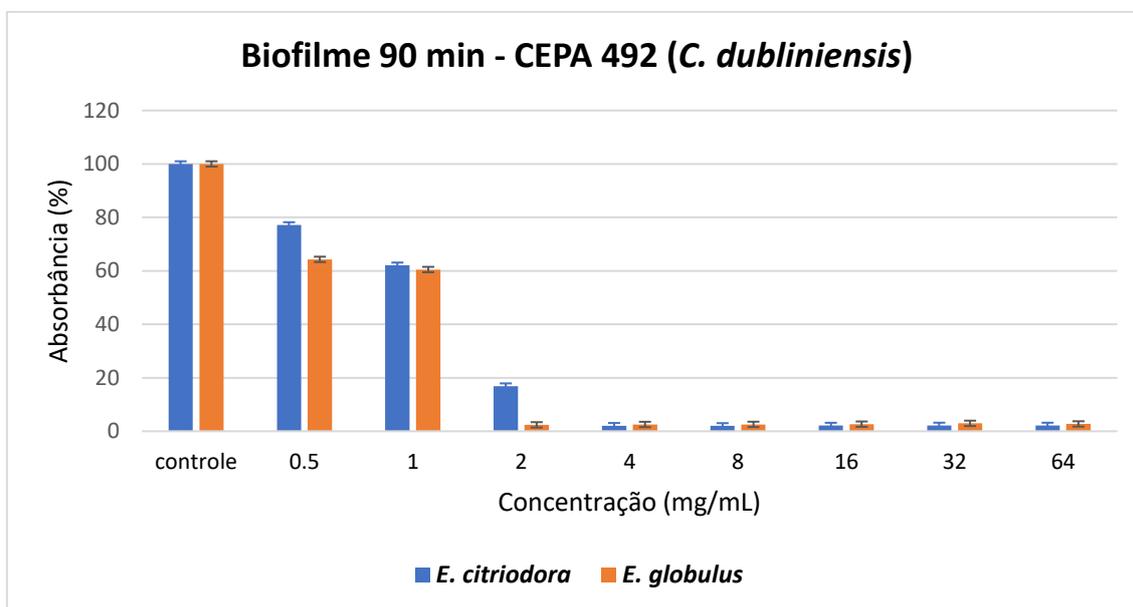
Comparado ao grupo controle (não-tratado), o biofilme de 90 min de *C. albicans* demonstrou baixa viabilidade celular até a concentração 4 mg/mL de *E. citriodora* e 2 mg/ml de *E. globulus*, apresentando 1,9% e 2% de atividade metabólica, respectivamente (Gráfico 1). Para o biofilme de *C. dubliniensis* a baixa atividade metabólica também foi controlada até as concentrações de 4 mg/mL de *E. citriodora* e 2 mg/ml de *E. globulus*, apresentando viabilidade das células presentes de 2 e 2,4%, respectivamente (Gráfico 2). Em concentrações menores dos óleos essenciais houve aumento da expressão da atividade metabólica nos biofilmes de ambas as espécies testadas

Gráfico 1 – Viabilidade celular (%) do biofilme em fase de adesão (90 minutos) da cepa clínica 205 (*C. albicans*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*.



Estatística ANOVA, variação *Dunnett*, bilateral, todas as concentrações testadas apresentaram $p < 0,01$

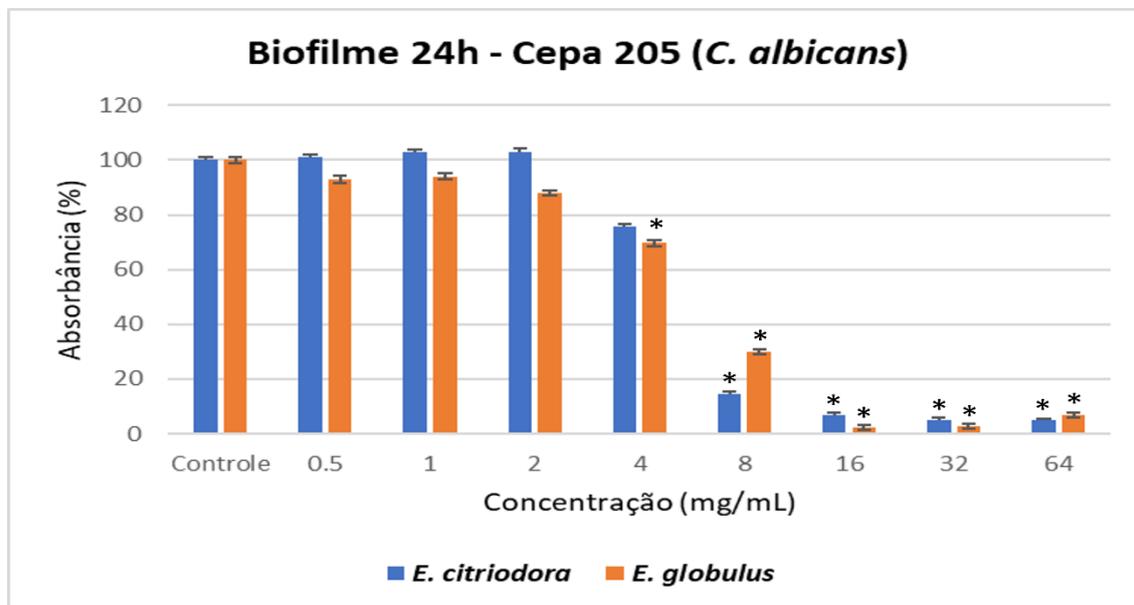
Gráfico 2 – Viabilidade celular (%) do biofilme em fase de adesão (90 minutos) da cepa clínica 492 (*C. dubliniensis*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*.



Estadística ANOVA, variação *Dunnett*, bilateral, todas as concentrações testadas apresentaram $p < 0,01$

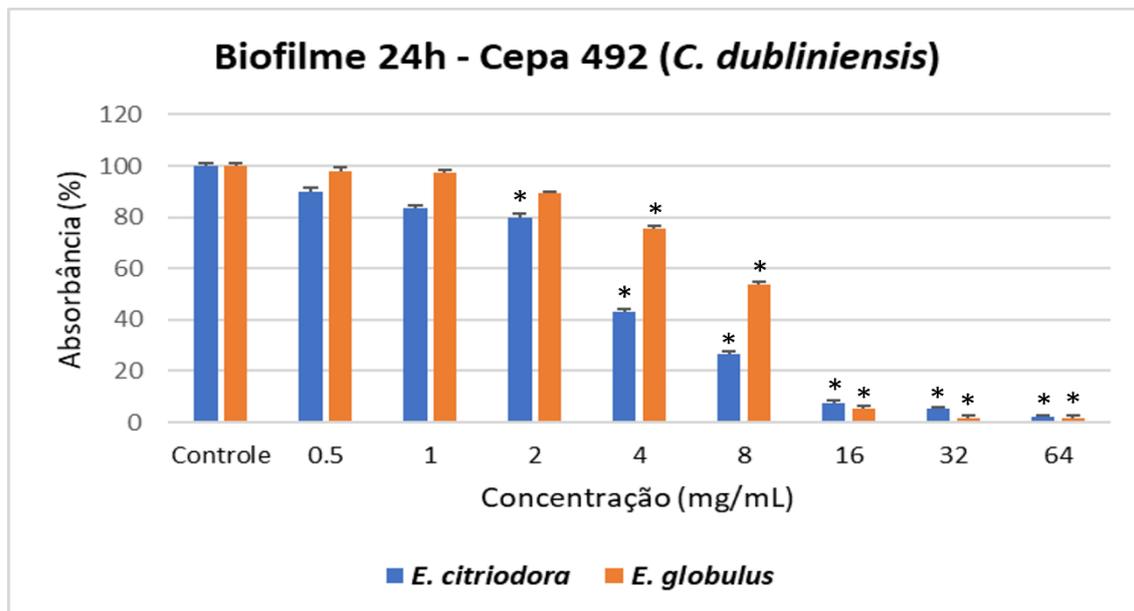
O biofilme de 24 horas das cepas clínicas de *C. albicans* e *C. dubliniensis* também foram avaliados na presença dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*. Comparado ao grupo controle (não-tratado), o biofilme de 24 horas de *C. albicans* demonstrou viabilidade celular reduzida até a concentração 8 mg/mL para ambos os óleos essenciais, demonstrando atividade metabólica de 14,5% e 29,9%, respectivamente (Gráfico 3). Já no biofilme de cepa de *C. dubliniensis* os resultados obtidos demonstram que até as concentrações de 8 mg/mL de *E. citriodora* e 16 mg/mL de *E. globulus* foram capazes de reduzir a atividade metabólica do biofilme, comparado ao controle, apresentando viabilidade celular de 26,7% e 5,4%, respectivamente (Gráfico 4).

Gráfico 3 – Viabilidade celular (%) do biofilme 24 horas da cepa clínica 205 (*C. albicans*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*.



Estatística ANOVA, variação *Dunnett*, bilateral, (*) concentrações testadas que apresentaram $p < 0,05$

Gráfico 4 – Viabilidade celular (%) do biofilme 24 horas da cepa clínica 492 (*C. dubliniensis*) tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*.

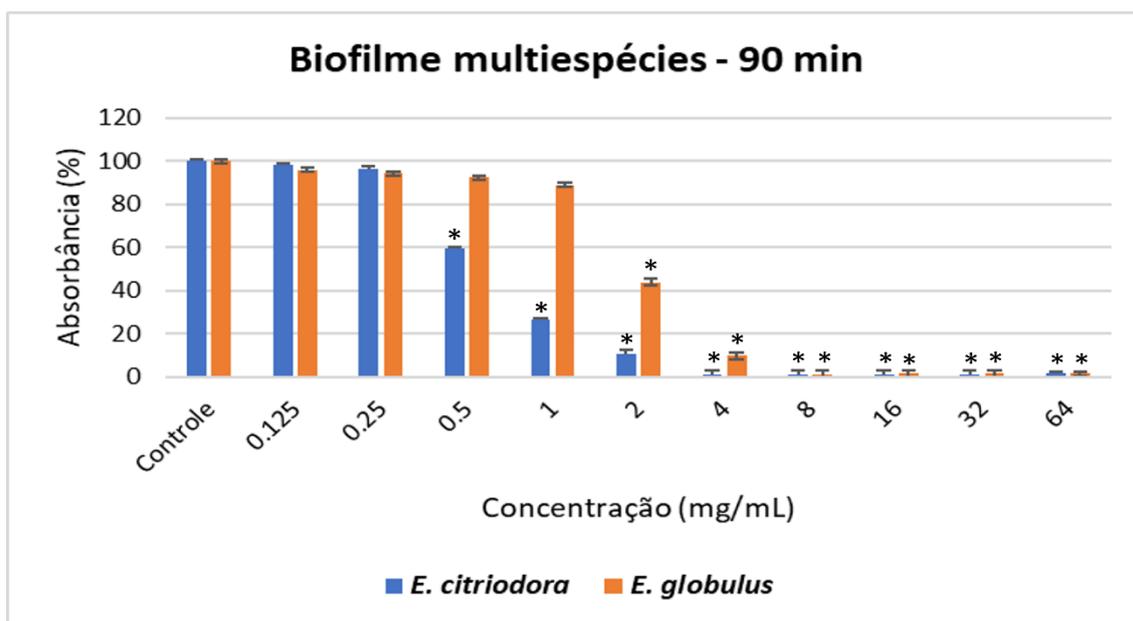


Estatística ANOVA, variação *Dunnett*, bilateral, (*) concentrações testadas que apresentaram $p < 0,05$

5.6 Avaliação da atividade metabólica do biofilme misto de *C. albicans* e *S. mutans* após tratamento com os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*

O biofilme de *C. albicans* (SC5314) e *Streptococcus mutans* (UA 159) de 90 minutos, quando comparado ao grupo controle (não-tratado), demonstrou baixa atividade metabólica até a concentração 1 mg/mL com 26,3% de viabilidade celular do biofilme quando tratado com *E. citriodora* e 4 mg/mL com 9,7% de viabilidade para *E. globulus*. O aumento da atividade metabólica do biofilme 90 minutos foi observada a partir da concentração 0,5 mg/mL de *E. citriodora* com viabilidade celular de 59,3% e 2 mg/mL de *E. globulus* com viabilidade de 43,9% (Gráfico 5).

Gráfico 5 – Viabilidade celular (%) do biofilme de 90 minutos de *C. albicans* e *S. mutans* tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*.

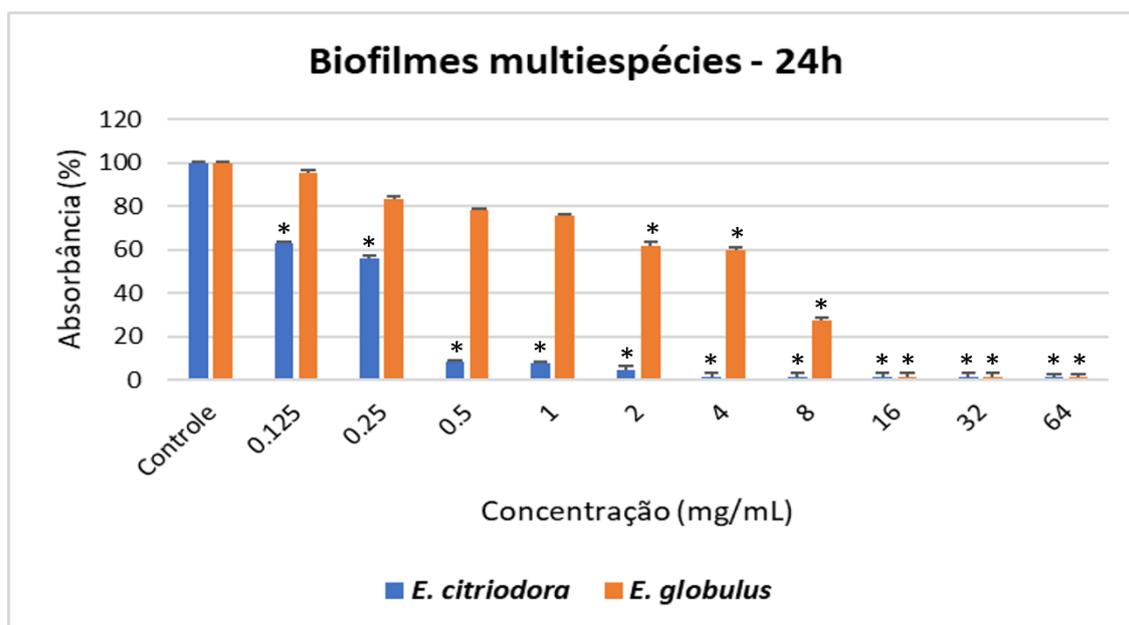


Estadística ANOVA, variação *Dunnett*, bilateral, (*) concentrações testadas que apresentaram $p < 0,05$

Foi avaliado também o biofilme de 24 horas *C. albicans* e *Streptococcus mutans*, quando comparado ao grupo controle (não-tratado), onde demonstrou baixa atividade metabólica até a concentração 0,5 mg/mL com 8,2% de viabilidade celular do biofilme quando tratado com *E. citriodora* e 8 mg/mL com 27,2% de viabilidade para

E.globulus. A partir da concentração 0,25 mg/mL de *E. citriodora* foi observado um aumento da atividade metabólica do biofilme com viabilidade celular de 56,2% e 4 mg/mL de *E. globulus* com viabilidade de 59,7% (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Viabilidade celular (%) do biofilme de 24 horas de *C. albicans* e *S. mutans* tratado com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*.



Estadística ANOVA, variação *Dunnett*, bilateral, (*) concentrações testadas que apresentaram $p < 0,05$

5.7 Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV)

5.7.1 Análise dos biofilmes 90 minutos e 24 horas de *Candida albicans* SC5314 tratados com *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* sobre reembasamento de prótese dentária por MEV

As análises em Microscopia Eletrônica de Varredura mostraram células do grupo controle com superfície regular, hifas em quantidades consideráveis e com superfície homogênea (Imagem A e B). Quando tratado com *E. citriodora* na concentração de 2 mg/mL, observou-se diminuição significativa das hifas e podendo-se detectar algumas células com deformidades perdendo sua forma original (Imagem

C e D). Quando tratado com o óleo essencial de *E. globulus* na concentração de 8 mg/mL, detectou-se grande diminuição nas hifas quando comparado ao controle e deformidades nas poucas células presentes (Imagem E e F) da Figura 2.

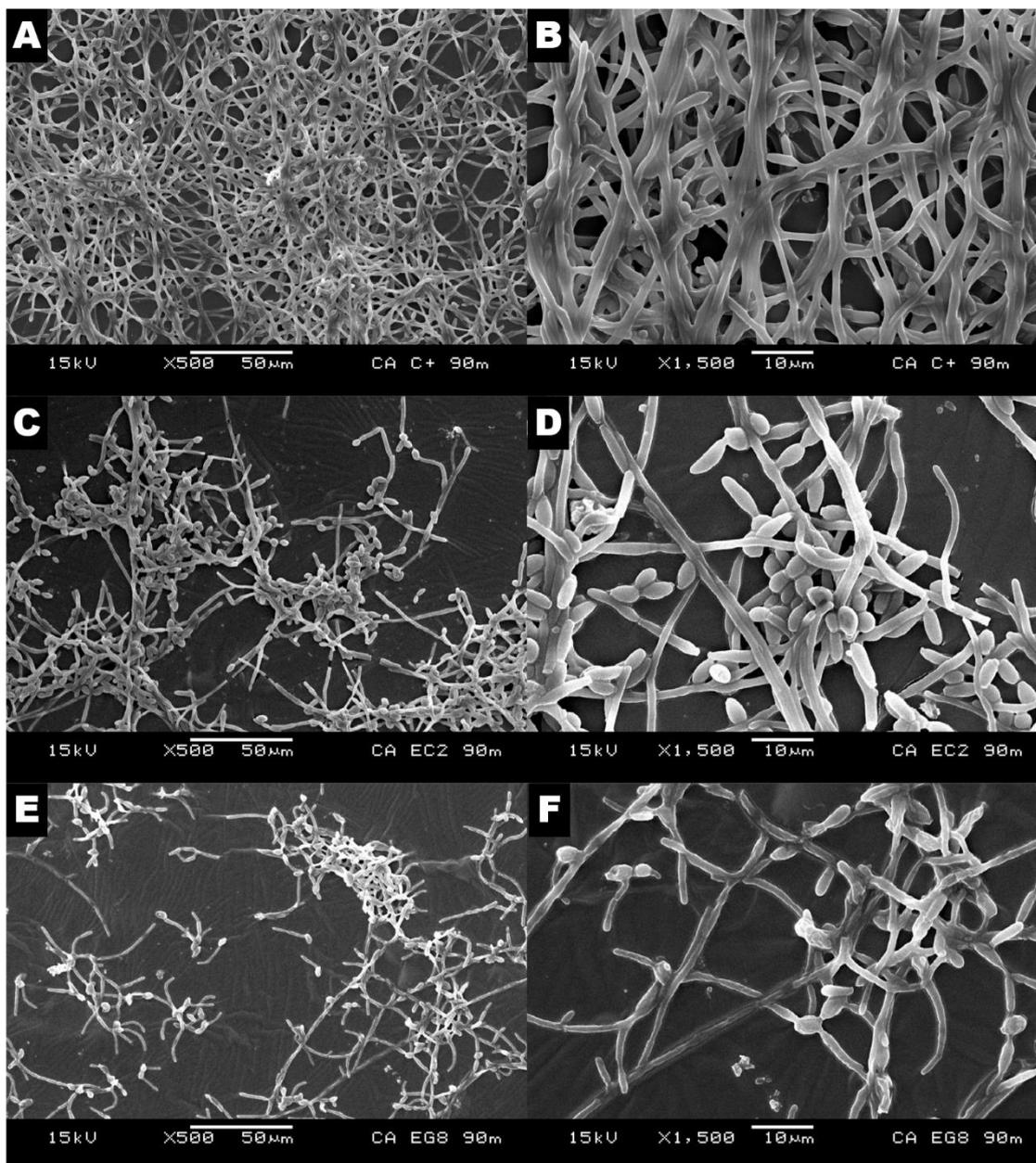


Figura 2: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura de biofilme 90 minutos de *Candida albicans* SC5314 após exposição aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. A e B: Controle de *C. albicans*, sem tratamento; C e D: Tratamento com a concentração de 2 mg/mL de *E. citriodora*; E e F: Tratamento com a concentração de 8 mg/mL de *E. globulus*.

Nas análises de microscopia eletrônica de varredura, no controle do biofilme 24 horas foram observadas células com superfície regular e hifas com superfície homogênea, poucos blastoconídios presentes, expressos nas imagens A e

B. Nas imagens do tratamento com *E. citriodora* na concentração de 2 mg/mL, observou-se diminuição na quantidade de células presentes, com maior quantidade de blastoconídios em relação ao controle onde a prevalência é de hifas, podendo ser observado nas imagens C e D. Quando tratado com o óleo essencial de *E. globulus* na concentração de 8 mg/mL, foi observado apenas diminuição da quantidade de células, demonstrado nas imagens E e F da figura 3.

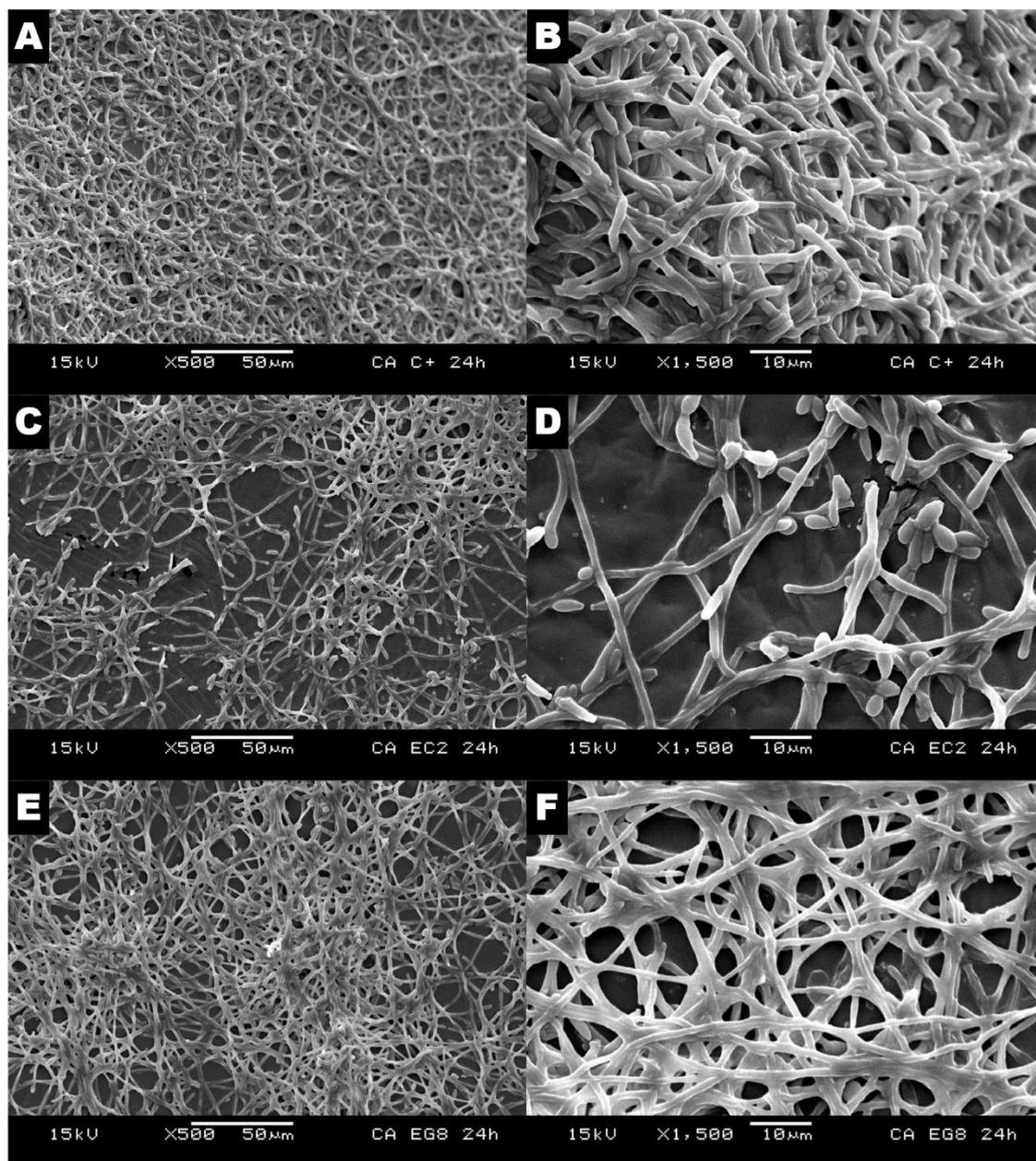


Figura 3: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura de biofilme 24 minutos de *Candida albicans* SC5314 após exposição aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. A e B: Controle de *C. albicans*, sem tratamento; C e D: Tratamento com a concentração de 2 mg/mL de *E. citriodora*; E e F: Tratamento com a concentração de 8 mg/MI de *E. globulus*.

5.7.2 Análise do biofilme 24 horas de *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* tratados com *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* sobre reembasamento de prótese dentária por MEV

O biofilme de 24 horas de multiespécie de *C. albicans* e *S. mutans* sobre reembasamento de prótese dentária também foi analisado em microscopia eletrônica de varredura após exposto aos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*, nas concentrações de 8 mg/ml para ambos os óleos. No controle, na figura 4 (imagens A e B), pode-se observar que após 24 horas de incubação, o biofilme se apresenta com células de *Streptococcus mutans* em maioria, em relação às células da levedura, ambas as células se apresentam integras e presença de matriz extracelular. Quando o biofilme é exposto ao óleo essencial de *E. citriodora* nota-se uma diminuição significativa das células de *S. mutans* e um aumento do número de células de *C. albicans*, há diminuição da matriz extracelular, porém não há deformidades das células presentes (imagens C e D); quando o biofilme é exposto ao óleo essencial de *E. globulus*, observou-se o oposto em relação ao tratamento com *E. citriodora*, há a diminuição das células de *C. albicans*, quase inexistente, a e prevalência de células de *S. mutans*, há também uma diminuição da biomassa do biofilme em relação ao controle (imagens E e F).

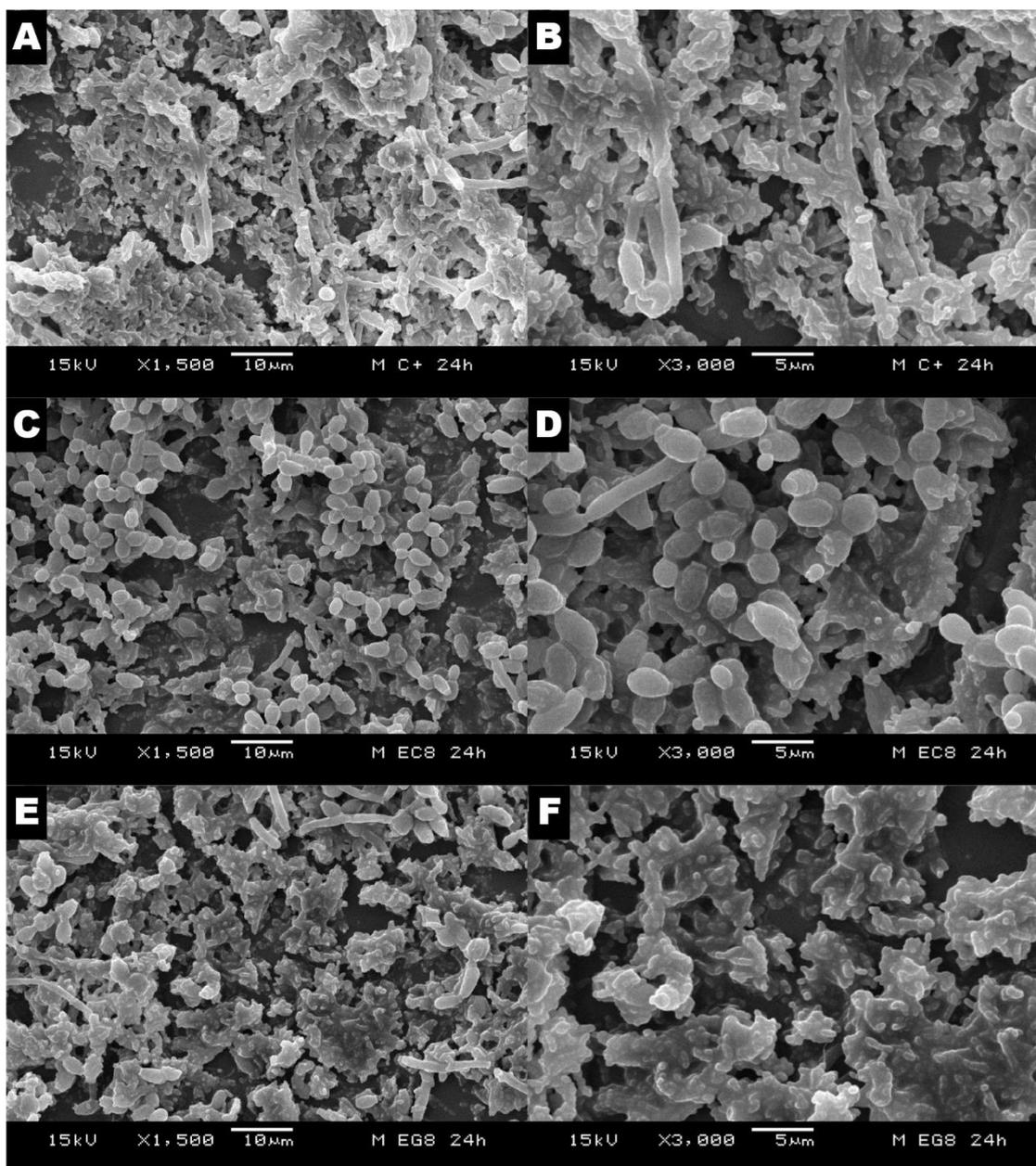


Figura 4: Imagens adquiridas por microscopia eletrônica de varredura do biofilme de 24 horas de *Candida albicans* SC5314 e *Streptococcus mutans* UA 159 após exposição aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. A e B: Controle do biofilme multiespécie, sem tratamento; C e D: Tratamento com a concentração de 8 mg/mL de *E. citriodora*; E e F: Tratamento com a concentração de 8 mg/mL de *E. globulus*.

5.8 Análise do processo de formação do biofilme de *Candida albicans* por Microscopia equipada com *Time-lapse*

No ensaio de *Time Lapse* foi analisada a progressão do biofilme na presença dos óleos essenciais em diferentes concentrações e no período de hora em hora durante 24h. A progressão do biofilme foi testada em três concentrações diferentes para cada óleo essencial, para *Eucalyptus citriodora* foram testadas as concentrações de 0,5, 1 e 2 mg/ml, enquanto para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foram testadas concentrações de 2, 4 e 8 mg/ml.

Na presença do óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* foi observado uma paralisação na progressão do biofilme a partir da quarta hora após o início da incubação nas concentrações de 1 e 2 mg/ml, enquanto a concentração de 0,5 mg/ml houve apenas uma diminuição na progressão do biofilme em relação ao controle. Já na presença do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* foi observado que apenas a concentração de 8 mg/ml demonstrou diminuição da progressão do biofilme.

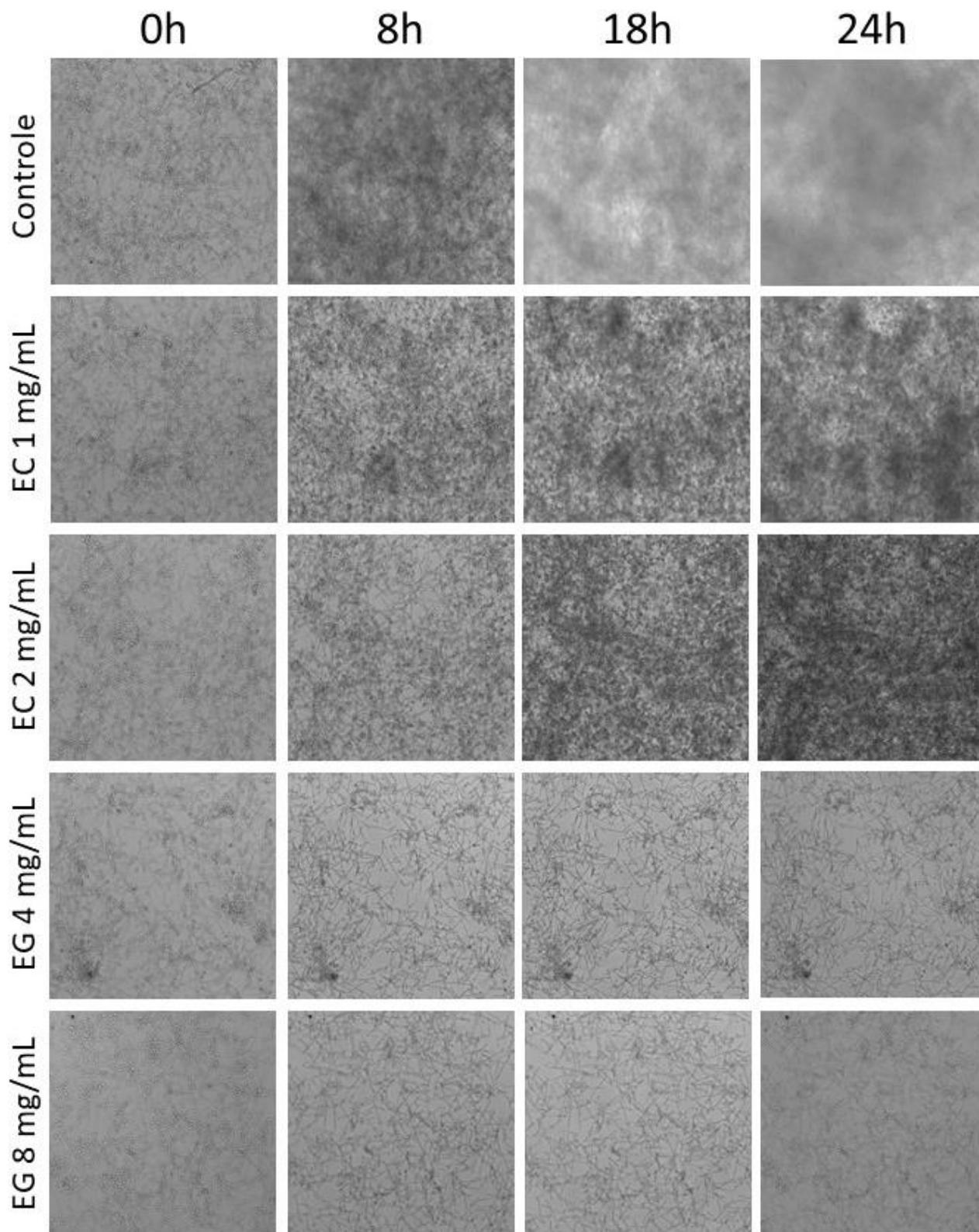
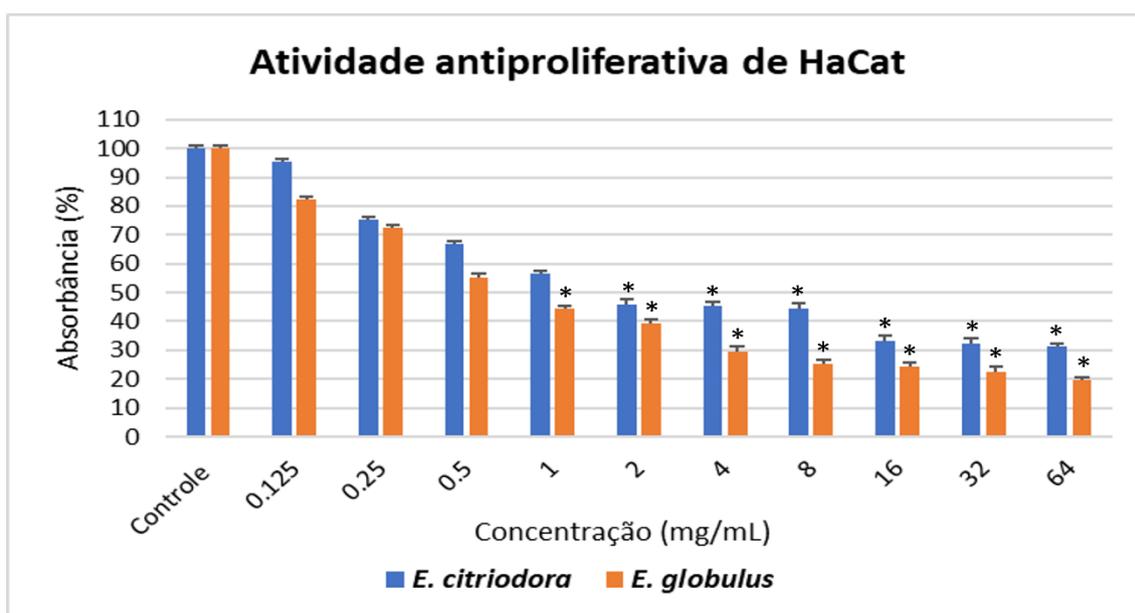


Figura 5: Imagens representativas dos tempos de progressão do biofilme de *Candida albicans* SC5314 frente ao tratamento com diferentes concentrações dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*. Colunas mostram os tempos e linhas das concentrações dos óleos essenciais utilizadas nos tratamentos.

5.9 Avaliação da Atividade antiproliferativa de células *HaCat*

Para o ensaio da atividade antiproliferativa foram testadas as células epiteliais *HaCat*, linhagem celular provenientes de queratinócitos normais humanos imortalizada. As análises de absorvância foram feitas seguindo o parâmetro IC₅₀. Após o tratamento com os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* nas concentrações entre 64 e 0,125 mg/ml foi observado viabilidade celular acima de 50% até a concentração de 1 mg/mL para *E. citriodora* e até 0,5 mg/mL para *E. globulus* comparados ao controle de crescimento celular, sem a exposição ao óleo. As concentrações maiores que as citadas anteriormente, apresentou viabilidade celular abaixo de 50%. *E. citriodora* mostrou ser menos citotóxico do que *E. globulus* (Gráfico 7).

Gráfico 7 – Viabilidade celular (%) de células *HaCat* após tratamento com os óleos de *E. citriodora* e *E. globulus*.



Varição *Dunnett*, bilateral, (*) concentrações testadas que apresentaram $p < 0,05$ (Estatística ANOVA).

6. DISCUSSÃO

As infecções causadas pelo fungo do gênero *Candida* tem surgido como um importante problema de saúde, ocasionando importantes taxas de mortalidade e aumentando os custos médicos para governos e pacientes hospitalizados. A espécie *Candida albicans* é a principal causa de candidíase na maioria das situações clínicas, isso se deve a sua capacidade de infectar vários nichos de hospedeiros sendo atribuída à uma ampla série de fatores de virulência e propriedades de aptidão biológica (Lopes *et al.*, 2022). O aumento da resistência antifúngica vem sendo uma ameaça ao limitado arsenal de antifúngicos existentes. A carência de classes de drogas antifúngicas, associada à plasticidade intrínseca do genoma fúngico, vem promovendo adaptação e sobrevivência desses microrganismos (Tortorano *et al.*, 2021). Sendo assim, o interesse por substâncias que tenham a capacidade de agir contra esses organismos sem alterar as condições do hospedeiro impulsionaram pesquisadores a procurar esses componentes biológicos em plantas, já que estas tem evidenciado um poder curativo, mesmo que empiricamente ao longo dos anos.

Na presente pesquisa as atividades antifúngicas e antibacterianas dos óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* foram avaliadas através do método de microdiluição (CLSI, 2008). Nos ensaios os óleos foram testados contra isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida dubliniensis* e cepas padrão do gênero *Streptococcus*. Os isolados clínicos apresentaram sensibilidade à ambos os óleos testados, assim como as espécies de *Streptococcus*. As Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais foram mais baixas contra as cepas de origem clínica do que para as cepas de *Streptococcus*. Elas não apresentaram perfil de resistência quando tratadas com antifúngicos comerciais. Ambos os óleos demonstraram, na sua maioria, perfil fungicida quando comparados a CIM, e quando testados contra os *Streptococcus*, demonstraram perfil bactericida em comparação a CIM de todas as cepas. O OE de *E. citriodora* mostrou-se mais eficiente que o de *E. globulus*, capazes de inibir o crescimento dos isolados clínicos e das cepas padrão de *Streptococcus* spp em concentrações bem menores que as concentrações de *E. globulus*. Esses resultados, corroboram com os dados encontrados na literatura em relação a atividade antimicrobiana dos óleos de

Eucalyptus spp contra diversas espécies de fungos e bactérias, no entanto, as CIMs encontradas são variáveis. Esses dados sugerem, por sua vez, que as composições dos óleos podem ser distintas, havendo ainda diversidade em relação à metodologia envolvendo a CIM.

Para investigar a estrutura celular alvo dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp, submeteu-se à análise qualitativa de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As células de *Candida* spp., após o tratamento com os óleos essenciais, demonstraram danos em estruturas externas e internas, como enovelamento da membrana citoplasmática, ausência parcial da membrana, dano a parede celular, grande quantidade de vacúolos e desorganização do conteúdo citoplasmático, além de perda da morfologia celular. A concentração de 0,250 mg/mL de *E. citriodora* foi capaz de provocar as mesmas alterações celulares que 4 mg/mL de *E. globulus*, se mostrando mais eficiente quando comparados. Outros autores também relataram danos celulares causados às células de *Candida albicans* após tratamento com óleos essenciais. Stringaro *et al.*, (2014) e Wijesinghe *et al.*, (2021), mostraram que após o tratamento com óleos essenciais e em sinergismo com antifúngico comercial, as células de *C. albicans* apresentaram danos celulares, como presença de vacúolos no citoplasma, danos na parede celular e granulações intracelulares. Os dados obtidos nesta pesquisa, em concomitância aos dados da literatura, indicam que esses óleos essenciais, têm potencial antifúngico, promovendo danos e morte celular, podendo atuar como uma alternativa de tratamento contra infecções causadas por estes microrganismos, isoladamente ou em sinergismo com antifúngicos comerciais.

Os óleos essenciais foram testados ainda, contra alguns fatores de virulência expressos por espécies de *Candida*, como a formação de hifas da cepa *C. albicans* SC5314. Os resultados do teste demonstram que em diferentes concentrações os óleos têm a capacidade de inibir e/ou atrasar a formação de hifas pela cepa *C. albicans* SC5314. A concentração de 0,250 mg/mL de *E. citriodora* inibiu 100% a formação destas estruturas no tempo de 4h, enquanto *E. globulus* inibiu 100% com somente 2 mg/mL. Esses resultados sugerem primeiramente, que a capacidade de atuar biologicamente contra microrganismos depende da espécie em questão e, que os óleos essenciais atuam, de modo geral, de maneira dose-dependente sobre a formação dessas estruturas por esses microrganismos. A literatura disponível tem demonstrado a ação de óleos essenciais e seus compostos contra esta estrutura. O

eucaliptol (1,8-cineol), composto encontrado nesses componentes biológicos de *Eucalyptus* spp, atua inibindo a formação de hifas, sugerindo que o composto interfere na transição de levedura para hifa, como demonstra Gupta *et al.*, (2020). Em estudo realizado por Sharma e colaboradores (2020), foi observado a inibição da transição morfológica de *Candida* spp pelo composto citrionelol, presente abundantemente no óleo essencial de *E. citriodora*, em meios de indução líquidos e sólidos. Um levantamento feito por Khan & colaboradores (2021) na literatura, mostra que uma gama de estudos realizados com compostos derivados de plantas medicinais mostrou-se eficiente na inibição do tubo germinativo, estrutura importante na patogenicidade de espécies de *Candida* spp. Entre os compostos citados por Khan encontra-se o Eucarobustol, um monoterpênóide derivado de espécies do gênero *Eucalyptus*. O Eucarobustol, em estudo feito por Liu *et al.*, (2017), mostrou igualmente atividades antifúngicas atuando na via de regulação negativa da expressão de genes relacionados ao crescimento de hifas e genes que codificam proteínas de superfície. Esses dados, em conjunto, apontam para uma atuação importante dos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp. contra a formação do tubo germinativo de espécies de *Candida*, podendo ser utilizado como uma alternativa de inibição do dimorfismo celular desses microrganismos, mecanismo importante para a patogenicidade de *Candida* spp.

Outro fator de virulência de espécies de *Candida*, os biofilmes, foram testados na presença dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*. Os resultados demonstraram que os óleos essenciais têm potencial inibitório na formação de biofilmes e capacidade de desestabilizar esta estrutura. Foram testados na fase de adesão (90 minutos) e na fase intermediária (24 horas) dos biofilmes de isolados clínicos de *Candida albicans* (cepa 205) e *Candida dubliniensis* (cepa 492). O biofilme em fase de adesão permite analisar o comportamento dos óleos essenciais de maneira preventiva, já o biofilme 24 horas, analisar a desestruturação de um biofilme pré-formado quando expostos a esses componentes. Esses dois fatores, em conjunto, indicam uma propriedade efetiva de ação antimicrobiana desses componentes bioativos, reforçando a idéia da contribuição desses compostos como uma alternativa viável antimicrobiana, ou como coadjuvante no tratamento médico. Os óleos obtiveram mais efetividade contra os biofilmes em fase de adesão, sendo possível inibir a formação dessas estruturas em baixas concentrações. O óleo essencial de *E.*

globulus mostrou-se mais eficiente contra a progressão do biofilme de ambas as espécies fúngicas do que *E. citriodora*. O biofilme de 90 min exposto a 2 mg/mL dos óleos demonstrou que a cepa de *C. albicans* teve nesta concentração a taxa de atividade metabólica de 59% para *E. citriodora* e apenas 2% quando tratado com *E. globulus*. Para o tratamento do biofilme da cepa de *C. dubliniensis*, o mesmo comportamento dos óleos foi detectado. *E. citriodora* na concentração de 2 mg/mL apresentou a taxa de atividade metabólica em aproximadamente 17% e *E. globulus* de 2%. Esses dados, indicam uma maior efetividade do óleo de *E. globulus* no tratamento dos biofilmes em fase de adesão de ambas as cepas testadas. Os dados desse ensaio, corroboram com os resultados do teste de inibição da formação de hifas, no qual os óleos foram capazes de inibir a formação dessas estruturas, importantes para a formação dos biofilmes, confirmado pelas imagens da MEV. Esses dados demonstram que os óleos essenciais em baixas concentrações auxiliam na prevenção da formação de biofilmes de espécies de *Candida*, o que reafirma a sua capacidade de agir como antimicrobianos. Os óleos também foram capazes de desestabilizar o biofilme pré-formado (24 horas) de maneira dose-dependente. Os biofilmes de 24h demonstraram que o óleo essencial de *E. citriodora* foi mais efetivo contra a cepa de *C. dubliniensis*, enquanto o óleo de *E. globulus* demonstrou maior efetividade contra a cepa de *C. albicans*. O biofilme de 24h de *C. dubliniensis* foi mais susceptível ao tratamento dos óleos essenciais em relação ao de *C. albicans*, apresentando menor taxa de atividade metabólica quando comparados nas mesmas concentrações.

A literatura disponível tem relatado o potencial efeito antibiofilme dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*. Barbosa & colaboradores (2018), demonstraram que ambos os óleos essenciais possuem ação contra os biofilmes em fase de adesão e pré-formado de *Candida albicans*. Em estudos de Trindade e colaboradores (2022), foi constatado a atividade antibiofilme de citronelal, composto majoritário do óleo essencial de *E. citriodora*, contra isolados clínicos de *Candida albicans*, sugerindo que o composto interage com a membrana celular das células. Da mesma forma no estudo de Gupta & colaboradores (2021), foi observado atividade antibiofilme do composto Eucaliptol (1,8-cineol), composto majoritário do óleo essencial de *E. globulus*, em biofilmes em formação e maduro de cepas padrão e isolados clínicos de *Candida albicans* e *Candida glabrata*. Neste estudo o Eucaliptol

foi capaz de gerar espécies reativas de oxigênio, interrompendo o ciclo celular na fase G1, promovendo alteração na membrana mitocondrial e enzimas hidrolíticas, e também na alteração da expressão gênica na biogênese da parede celular e na secreção de enzimas hidrolíticas. O óleo essencial de *E. globulus* demonstrou ainda possuir atividade antibiofilme também contra espécies bacterianas, como a cepa *Staphylococcus aureus* e SAMR/*S. aureus* metilicina resistente (Vieira *et al.*, 2017; Merghni *et al.*, 2018).

De modo geral, ambos os óleos de *Eucalyptus* foram efetivos contra os biofilmes em fase de adesão e fase intermediária de ambas as cepas. Os resultados alcançados, corroboram com dados da literatura, que indicam que óleos essenciais possuem atividade antibiofilme contra espécies de *Candida*. Esses dados também sugerem que os biofilmes em adesão são mais vulneráveis à ação dos óleos em questão, quando comparados ao biofilme pré-formado, supostamente em virtude de uma maior complexidade estrutural e biológica, dificultando a penetração desses biocomponentes de natureza hidrofílica em uma matriz extracelular composta em sua grande maioria de água.

Os biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *S. mutans* também foram avaliados em relação à sua viabilidade celular. Nesses testes, foi observado que no biofilme de 90 min, o óleo essencial de *E. citriodora* mostrou-se mais eficaz quando comparado ao *E. globulus*, assim como no biofilme 24h, sendo que ambos os óleos foram capazes de diminuir a atividade metabólica dos biofilmes em doses dependentes. Os dados demonstraram que os óleos possuem atividade distintas em relação as fases dos biofilmes, sendo *E. globulus* mais efetivo na fase inicial e *E. citriodora* na fase intermediária. Testes adicionais incluindo aspectos bioquímicos e genéticos, serão necessários para esclarecer a ação de cada óleo, e ampliar a compreensão deste fenômeno.

Os dados obtidos no ensaio de viabilidade celular de biofilme multiespécie corroboram com a literatura presente. Goldbeck & colaboradores (2014), relataram que a formação do biofilme de *S. mutans* foi inibida na presença do óleo essencial de *E. globulus*, sendo até mesmo mais efetivos quando comparados ao NaF comercial (fluoreto de sódio) a 0,1%. Rasooli (2008), demonstrou que outras espécies de *Eucalyptus* também tem a capacidade de inibir o desenvolvimento de biofilmes cariogênicos. Há diversos estudos que relatam a capacidade dos óleos essenciais

inibirem a progressão do biofilme de microrganismos orais, como *Candida albicans* e *Streptococcus mutans* (Aires *et al.*, 2021; Jafri *et al.*, 2020; Septiana *et al.*, 2020). Embora haja necessidade de maiores investigações sobre a atuação dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* contra o biofilme multiespécie de *C. albicans* e *S. mutans* em relação ao seu mecanismo de ação, podemos constatar que ambos os OE atuam na inibição ou desestabilização desses biofilmes, conforme mostram os resultados obtidos nos testes.

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi utilizada com a finalidade de investigar possíveis alterações morfológicas e na arquitetura dos biofilmes de espécies de *Candida* e multiespécie, após exposição aos óleos essenciais. Os biofilmes de 90 min e 24h de *C. albicans* e *C. dubliniensis* foram expostos a concentração de 2 mg/mL de *E. citriodora* e 8 mg/mL de *E. globulus*. Ambos os tratamentos foram capazes de provocar deformidades na estrutura celular, como perda da morfologia original das células, alterações nas superfícies das mesmas e hifas, como rugosidade, sendo possível observar alterações na estrutura dos biofilmes, como inibição e retardo na formação das hifas e diminuição do crescimento exponencial das células destes biofilmes. É possível observar através das imagens obtidas na MEV, que os óleos essenciais foram eficientes em ambos os biofilmes, porém foram mais eficazes contra os biofilmes testados em fase de adesão (90 min) causando maior dano a esta estrutura.

Os dados obtidos neste estudo corroboram com o estudo realizado anteriormente pelo nosso grupo e outros autores da literatura. Barbosa e colaboradores (2018), mostraram que os óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus* foram efetivos contra os biofilmes (90 min e 24h) da cepa de *C. albicans* SC5314, provocando alterações estruturais e morfológicas citadas anteriormente, e que a atuação dos óleos essenciais possui mais efetividade contra a fase inicial dos biofilmes, como foi evidenciado em outros ensaios desta pesquisa.

Os mecanismos de atuação destes óleos essenciais contra os biofilmes de *Candida* spp. ainda são pouco esclarecidos, mas os dados sugerem que a ação se dá em função da presença de terpenóides em sua composição, uma vez que, esses compostos têm a capacidade de desestabilizar a membrana celular e modular funções correlacionadas à membrana, como por exemplo, a permeabilidade seletiva e o *quórum-sensing* (sinalização celular), de acordo com Zore *et al.* (2011). Anibal e

colaboradores (2010), pesquisando *Mentha* spp., sugerem que a toxicidade às células de *Candida* spp., é devido a presença de flavonóides e terpenos presentes nos óleos essenciais do gênero, devido ao grau de lipofilicidade e pelas interações com constituintes da membrana celular e seu arranjo.

Os biofilmes multiespécie de *C. albicans* e *S. mutans* crescidos sobre reembasador de prótese dentária, expostos aos óleos essenciais de *Eucalyptus* também foram analisados em Microscopia Eletrônica de Varredura, a fim de se observar alterações morfológicas e estruturais do biofilme. Inicialmente observou-se nas imagens obtidas por MEV que há um comportamento distinto dos biofilmes na presença dos diferentes óleos. Quando expostos ao óleo de *E. citriodora* nota-se que há diminuição de *S. mutans* e aumento de *C. albicans*, enquanto, quando tratado com *E. globulus* o resultado obtido é contrário, maior prevalência de *S. mutans* e diminuição de *C. albicans*. Demais testes serão levados a efeito, no entanto, com a finalidade de compreender o mecanismo de atuação dos óleos essenciais sobre o biofilme dessas espécies. A princípio, os dados obtidos sugerem que o óleo *E. citriodora* possui maior atuação contra as células bacterianas, enquanto *E. globulus* atua mais efetivamente contra as células fúngicas.

A somatória dos resultados obtidos nos ensaios de exposição dos diferentes biofilmes aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp, juntamente com os dados encontrados na literatura, indicam efeitos satisfatórios em relação a capacidade de inibir e/ou retardar a progressão de biofilmes e desestruturar essas estruturas pré-formadas de modo geral, sugerindo o seu uso como uma alternativa antimicrobiana na ação contra os biofilmes, quer seja como agente principal ou como coadjuvantes, em sinergismo com demais compostos.

A progressão em tempo real do biofilme de *Candida albicans* SC5314 exposto aos óleos essenciais foi analisada através da microscopia *Time-Lapse* pelo período de 24 horas. Pode-se reafirmar que a atuação dos óleos essenciais são dose dependente, sendo que os óleos essenciais nas concentrações de 2 mg/mL de *E. citriodora* e 8 mg/mL de *E. globulus* paralisaram e retardaram a progressão do biofilme em sua fase inicial. Esses dados corroboram com os resultados da análise da viabilidade celular e análises microscópicas dos biofilmes de espécies de *Candida*, onde foi observado que ambos os óleos essenciais foram mais eficazes na fase de

adesão do biofilme, nos quais concentrações mais baixas foram capazes de diminuir significativamente a atividade metabólica das células do biofilme.

Testes de citotoxicidade “*in vitro*” com células epiteliais *HaCat* (queratinócitos humanos imortalizados) foram levados a efeito. Os testes demonstraram que a viabilidade celular esteve acima de 50% na concentração igual e menor que 1 mg/mL para *E. citriodora* e 0,5 mg/mL para *E. globulus*, quando comparados ao grupo controle, sem exposição aos óleos. *E. citriodora* demonstrou possuir menos toxicidade em relação a *E. globulus*, quando comparados entre si, apesar da viabilidade celular das células *HaCat* estarem abaixo de 50% nas concentrações dos óleos que inibem 100% o crescimento de *Candida* spp. Esses dados sugerem a possibilidade de se utilizar os óleos essenciais em concentrações menores com o objetivo de inibirem uma porcentagem menor do crescimento fúngico, atuando como auxiliador do sistema imunológico, bem como serem utilizados de forma sinérgica em concentrações menores com antifúngicos comerciais, ou até mesmo em concentrações maiores como composto de pré-tratamento de superfícies que podem favorecer os colonizadores de biofilmes, como exemplo próteses dentárias, reembasadores dentários, cateter, entre outros.

Em estudos anteriores feitos em nossos laboratórios, foi avaliada a toxicidade dos óleos essenciais “*in vivo*”, utilizando o modelo de larva de *Galleria mellonella*, sistema experimental inovador, no qual o sistema imunológico destes insetos é funcionalmente e estruturalmente semelhantes ao sistema imunológico inato de mamíferos (Benaducci *et al.*, 2016; Ignasiak & Maxwell, 2017). Os testes realizados mostraram que após 72 horas de exposição aos óleos essenciais de *Eucalyptus* spp, todas as concentrações testadas apresentaram porcentagem de sobrevivência das larvas acima de 80%, demonstrando baixa toxicidade. Novos ensaios de toxicidade serão levados à feito em fases subsequentes da pesquisa, em futuro próximo, a fim de entender melhor os possíveis efeitos citotóxicos dos óleos essenciais de *E. globulus* e *E. citriodora* utilizando diferentes linhagens celulares e modelos “*in vivo*”, uma vez que, os óleos essenciais podem variar a disponibilidade dos seus compostos de acordo com a sazonalidade e condições de cultivo.

Em princípio, os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com demais resultados nessa linha de investigação, constatando as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de *E. citriodora* e *E. globulus*, o que sustenta e amplia a

convicção científica de que compostos derivados de plantas podem atuar de maneira relevante no embate de infecções fúngicas e bacterianas. Os dados obtidos nesta pesquisa, indicam que os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* podem se tornar uma possibilidade adicional e alternativa viável no combate a infecções microbianas presentes em humanos.

7. CONCLUSÃO

- Os óleos essenciais (OE) das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* são biologicamente ativos de maneira dose dependente contra as espécies de *Candida* e *Streptococcus* testadas em sua forma planctônica.
- Os OE possuem atividade fungicida/bactericida dose dependente contra as cepas testadas.
- As células de *C. albicans* tratadas com os óleos essenciais sofrem danos em várias estruturas celulares.
- Os OE possuem atividade inibitória para o tubo germinativo de *Candida albicans*.
- Os OE das folhas de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* são biologicamente ativos nos biofilmes em fase de adesão e formação dose dependente, de isolados clínicos de *C. albicans* e *C. dubliniensis*.
- Os OE diminuem a atividade metabólica dos biofilmes multiespécies de *Candida albicans* x *Streptococcus mutans*.
- Os OE de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus*, alteram a morfologia e estrutura dos biofilmes de espécies de *Candida*, assim como em biofilmes multiespécies formados por *C. albicans* e *S. mutans*.
- Ambos os óleos essenciais são mais efetivos na fase inicial dos biofilmes.
- Os óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* são citotóxicos dose-dependente em células *HaCat*.

8. REFERÊNCIAS

Abers M, Schroeder S, Goelz L, Sulser A, Rose TS, Puchalski K, Langland J. Antimicrobial activity of the volatile substances from essential oils. *BMC Complement Med Ther.* 2021; 21 (1): 124.

Abranches J, Zeng L, Kajfasz JK, Palmer SR, Chakraborty B, Wen ZT, Richards VP, Brady LJ, Lemos JA. *Biology of Oral Streptococci.* 2018. 6 (5)

Ahmad A, Elisha IL, Vuuren SV, Vijoen A. Volatile phenolics: A comprehensive review of the anti-infective properties of an important class of essential oil constituents. *Phytochemistry.* 2021; 190: 112864.

Aires A, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. Antimicrobial Effects of Essential Oils on Oral Microbiota Biofilms: The Toothbrush In Vitro Model. *Antibiotics (Basel).* 2021; 10 (1): 21.

Ait-Quazzou A, Lorán S, Bakkali M, Laglaoui A, Rota C, Herrera A, Pagan R, Conchello P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils of *Thymus algeriensis*, *Eucalyptus globulus* and *Rosmarinus officinalis* from Morocco. *J Sci Food Agric.* 2011; 91: 2643–2651

Ali A, Khana MMA, Uddina M, Naeema M, Idrees M, Hashmi N, et al. Radiolytically depolymerized sodium alginate improves physiological activities, yield attributes and composition of essential oil of *Eucalyptus citriodora* Hook. *Carbohydrate Polymers.* 2014; 112: 134–144.

Alipanah H, Abdollahi A, Firooziyan S, Zarenezhad E, Jafari M, Osanloo M. Nanoemulsion and Nanogel Containing *Eucalyptus globulus* Essential Oil; Larvicidal Activity and Antibacterial Properties. *Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases.* 2022; 2022: 1-9.

Anibal PC, Sardi JCO, Peixoto ITA, Moraes JJC, Höfling JF. Conventional and alternative antifungal therapies to oral candidiasis. *Braz J Microbiol.* 2010; 41(4): 824–831.

Ansari P, Flatt PR, Harriott P, Abdel-Wahab YHA. Insulinotropic and antidiabetic properties of *Eucalyptus citriodora* leaves and isolation of bioactive phytochemicals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2021; 73 (8): 1049–1061

Ansari P, Flatt PR, Harriott P, Abdel-Wahab YHA. Insulinotropic and antidiabetic properties of *Eucalyptus citriodora* leaves and isolation of bioactive phytochemicals. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2021, 73: 1049–1061.

Araújo-Filho JV, Ribeiro WLC, André WPP, Cavalcante GS, Rios TT, Schwinden GM, Rocha LO, Macedo ITF, Morais SM, Bevilaqua CML, Oliveira LMB. Anthelmintic activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil and its major component, citronellal, on sheep gastrointestinal nematodes. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 2019; 28 (4): 644-651.

Arjona-Garcia C., Blancas J., Beltrán-Rodríguez L., Binnquist C. L., Bahena H. C., Moreno-Calles A. I., Sierra-Huelsz J. A., López-Medellín X. How does urbanization affect perceptions and traditional knowledge of medicinal plants? *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*. 2021; 17: 48

Azadmanesh J, Gowen AM, Creger PE, Schafer ND, Blankenship JR. Filamentation Involves Two Overlapping, but Distinct, Programs of Filamentation in the Pathogenic Fungus *Candida albicans*. *G3 Genes|Genomes|Genetics*. 2017; 7 (11): 3797–3808.

Barbosa JP, Oliveira TR, Puppim DGPB, Teixeira AL, Boni GC, Feiria SNB, Höfling JF. Anti-*Candida* Activity of Essential Oils from *Eucalyptus* species. A Preliminary Study. *Advances in Dentistry & Oral Health (ADOH)*. 2018; 8: 1-5.

Barbosa JP, Oliveira TR, Puppim DGPB, Teixeira AL, Boni GC, Feiria SNB, Buso-Ramos MM, Höfling JF. *Eucalyptus* spp: *Candida albicans* Antibiofilm Activity. *EC Dental Science*. 2019; 18 (4): 824-840.

Barbosa LCA, Filomeno CA, Teixeira RR. Chemical Variability and Biological Activities of *Eucalyptus* spp. Essential Oils. *Molecules*. 2016; 21(12): 1671.

Benaducci T, Sardi JCO, Lourencetti NMS, Scorzoni L, Gullo FP, Rossi SA. Virulence of *Cryptococcus* sp. Biofilms In Vitro and In Vivo using *Galleria mellonella* as an Alternative Model. *Front Microbiol.* 2016; 7: 290

Ben-Khalifa R., Gaspar F. B., Pereira C., Chekir-Ghedira L., Rodríguez-Rojo S. Essential Oil and Hydrophilic Antibiotic Co-Encapsulation in Multiple Lipid Nanoparticles: Proof of Concept and In Vitro Activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *Antibiotics*. 2021; 10: 1-15.

Benzaid C, Belmadani A, Tichati L, Djeribi R, Rouabhia M. Effect of *Citrus aurantium* L. Essential Oil on *Streptococcus mutans* Growth, Biofilm Formation and Virulent Genes Expression. *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (1): 54

Bhattacharya T., Dey P. S., Akter R., Kabir M T., Rahman M. H., Rauf A. Effect of natural leaf extracts as phytomedicine in curing geriatrics. *Experimental Gerontology*. 2021; 150: 111352.

Blásio A. D'Anneo A, Lauricella M, Emanuele S, Giuliano M, Pratelli G, Calvaruso G, Carlisi D. The Beneficial Effects of Essential Oils in Anti-Obesity Treatment. *Int J Mol Sci*. 2021, (21): 11832.

Boni GC, Busato SN, Santana PL, Anibal PC, Boriollo MFG, Buso-Ramos MM, Barbosa JP, Oliveira TR, Höfling JF. Antifungal and cytotoxic activity of purified biocomponents as carvone, menthone, menthofuran and pulegone from *Mentha* spp. *African Journal of Plant Science*. 2016; 10: 203-210.

Breijyeh Z, Jubeh B, Karaman R. Resistance of Gram-Negative Bacteria to Current Antibacterial Agents and Approaches to Resolve It. *Molecules* 2020. 25(6), 1340.

Busato de Feiria SN, Santana PL, Boni GC, Anibal PC, Boriollo MFG, Figueira GM, Sousa IMO, Pereira B, Foglio MA, Höfling JF. Essential oil composition of *Mentha* spp. extracted seasonally and their effects against *Candida* yeast growth and biofilm formation. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 2016; 4: 106-115.

Caballero-Lima D, Kaneva IN, Watton SP, Sudbery PE, Craven CJ. The Spatial Distribution of the Exocyst and Actin Cortical Patches Is Sufficient To Organize Hyphal Tip Growth. *Eukaryotic Cell*. 2013; 12 (7).

Cascaes MM, Carneiro OS, Nascimento LD, Moraes AAB, Oliveira MS, Cruz JN, Guilhon GMSP, Andrade EHA. Essential Oils from *Annonaceae* Species from Brazil:

A Systematic Review of Their Phytochemistry, and Biological Activities. *Int J Mol Sci.* 2021; 22 (22): 3-46.

Cernáková L, Light C, Salehi B, Rogel-Castillo C, Victoriano M, Martorell M, Sharifi-Rad J, Martins N, Rodrigues CF. Novel Therapies for Biofilm-Based *Candida* spp. Infections. *Advances in Microbiology, Infectious Diseases and Public Health.* 2019; 13: 93–123.

Ciofu O, M Noel, Jensen PO, Hoiby N. Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology.* 2022;20: 621–635

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard - Tenth Edition. CLSI document M07-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.

CLSI. Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing for Yeasts. Approved Standard - Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.

Correa MS, Schwambach J, Mann MB, Frazzon J, Frazzon APG (2019) Antimicrobial and antibiofilm activity of the essential oil from dried leaves of *Eucalyptus staigeriana*. *Arq Inst Biol* 86:1–8

Costa EMMB, Maia CMA, Vasconcelos PGS, Portela MB, Baroza CM, Cardoso AS, Soares RMA, Santos ALS. Influence of oral biofilm index, caries experience, and laboratory markers of disease progression on the oral carriage of *Candida* in HIV-infected and non-infected children: a cross-sectional study. *Braz J Microbiol.* 2022; 53 (4): 1969-1977.

Dadar M, Tiwari R, Karthik K, Chakrabortu S, Shahali Y, Dhama K. *Candida albicans* - Biology, molecular characterization, pathogenicity, and advances in diagnosis and control – An update. *Microbial Pathogenesis.* 2018: 117: 128-138.

Desai JV. *Candida albicans* Hyphae: From Growth Initiation to Invasion. *Journal of Fungi.* 2018; 4 (1): 10.

Dhakad AK, Pandey VV, Beg S, Rawat JM, Singh A, Biological, medicinal and toxicological significance of *Eucalyptus* leaf essential oil: a review. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.2017; 98 (3): 833-848.

Elansary HO, Salem MZM, Ashmawy NA, Yessoufou K, El-Settawy AAA. *In vitro* antibacterial, antifungal and antioxidant activities of *Eucalyptus* spp. leaf extracts related to phenolic composition. *Natural Product Research*. 2017; 31 (24): 2927-2930

Endo EH, Cortez DAG, Ueda-Nakamura T, Nakamura CV, Dias Filho BP. Potent antifungal activity of extracts and pure compound isolated from pomegranate peels and synergism with fluconazole against *Candida albicans*. *Res Microbiol*. 2010;161(7):534–40.

Fernandes RA, Monteiro DR, Arias LS, Fernandes GL, Delbem ACB, Barbosa DB. Biofilm formation by *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* in the presence of farnesol: a quantitative evaluation. *Biofouling*. 2016; 32 (3): 329-338.

Fuentefria AM, Pippi B, Dalla Lana DF, Donato KK, de Andrade SF. Antifungals discovery: an insight into new strategies to combat antifungal resistance. *Lett Appl Microbiol*. 2018; 66 (1): 2-13.

Giannobile WV, Wong DT. Salivary diagnostics: oral health and beyond! *J Dent Res*. 2011. 90: 1153–1154.

Gilles M, Zhao J, An M, Agboola S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. *Food Chemistry*. 2010; 119 (2): 731-737.

Goldbeck JC, Nascimento JE, Jacob RG, Fiorentini AM, Silva WP. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. *Industrial Crops and Products*. 2014; 60: 304-309.

Gullo FP, Sardi JCO, Santos VAFFM, Sangalli-Leite F, Pitangui NS, Rossi SA, de Paula e Silva ACA, et al. Antifungal activity of Maytenin and Pristimerin. *Hindawi Publishing Corporation*, 2012.

Gupta P, Pruthi V, Poluri KM. Mechanistic insights into *Candida* biofilm eradication potential of eucalyptol. *J Appl Microbiol*. 2021; 131 (1): 105-123.

Haenni M, Lupo A, Madec JY. Antimicrobial Resistance in *Streptococcus* spp. *Microbiol Spectr*. 2018. 6 (2).

Hammer KA, Carson CF, Riley TV. *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits germ tube formation by *Candida albicans*. *Medical Mycology*. 2000; 38: 355–362

Harkat-Madouri L, Asma B, Madani K, Si Disse ZBO, Rigou P, Grenier D, Allalou H et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. *Industrial Crops and Products*. 2015; 78: 48–153.

Ignasiak K, Maxwell A. *Galleria mellonella* (greater wax moth) larvae as a model for antibiotic susceptibility testing and acute toxicity trials. *BMC Res Notes*. 2017; 10: 428.

Jafri H, Banerjee G, Khan MAS, Ahmad I, Abulreesh HH, Althubiani AS. Synergistic interaction of eugenol and antimicrobial drugs in eradication of single and mixed biofilms of *Candida albicans* and *Streptococcus mutans*. *AMB Expr*. 2020; 10:185

Javed S, Shoaib A, Mahmood Z, Mushtaq S, Iftikhar S. Analysis of phytochemical constituents of *Eucalyptus citriodora* L. responsible for antifungal activity against post-harvest fungi. *Nat Prod Res*. 2012; 26 (18): 1732-1736.

Kaur J, Nobile CJ. Antifungal drug-resistance mechanisms in *Candida biofilms*. *Current Opinion in Microbiology*. 2023; 71: 102237.

Khan F, Bamunuarachchi NI, Tabassum N, Jo D, Khan MM, Kim YM. Suppression of hyphal formation and virulence of *Candida albicans* by natural and synthetic compounds. *Biofouling*. 2021; 37 (6): 626-655

Khazraei H, Shamsdin AS, Zamani M. In Vitro Cytotoxicity and Apoptotic Assay of *Eucalyptus globulus* Essential Oil in Colon and Liver Cancer Cell Lines. *J Gastrointest Cancer*. 2022; 53 (2): 363-369.

Korinek M, Handoussa H, Tsai YH, Chen YY, Chen MH, Chiou ZW, Fang Y, Chang FR, Yen CH, Hsieh CF, Chen BH, El-Shazly M, Hwang TL. Anti-Inflammatory and

Antimicrobial Volatile Oils: Fennel and Cumin Inhibit Neutrophilic Inflammation via Regulating Calcium and MAPKs. *Front Pharmacol.* 2021; 12: 674095.

Lemos JA, Burne RA. Um modelo de eficiência: tolerância ao estresse por *Streptococcus mutans*. *Microbiology.* 2008; 154: 3247–3255

Lemos JA, Palmer SR, Zeng L, Wen ZT, Kajfasz JK, Freires IA, Abranches J, Brady LJ. The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiology Spectrum.* 2019; 7 (1).

Lin YW, Chen J, Zhou X, Li YQ. Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilm formation by strategies targeting the metabolism of exopolysaccharides. *Crit Rev Microbiol.* 2021; 47 (5): 667-677.

Liu RH, Shang ZC, Li TX, Yang MH, Kong LY. In Vitro Antibiofilm Activity of Eucarbastol E against *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017; 61 (8): 1-15.

Lopes JP, Lionakis MS. Pathogenesis and virulence of *Candida albicans*. *Virulence.* 2022; 13 (1): 89-121.

Luqman S, Dwived GR, Darokar MP, Kalra A, Khanuja SPS. Antimicrobial activity of *Eucalyptus citriodora* essential oil. *International Journal of Essential Oil Therapeutics.* 2008; 2: 69-75.

Manju S, Malaikozhundan B, Vijayakumar S, Shanthi S, Jaishabanu A, Ekambaram P, Vaseeharan B (2016) Antibacterial, antibiofilm and cytotoxic effects of *Nigella sativa* essential oil coated gold nanoparticles. *Microb Pathog* 91:129–135

Martins J, Brijesh S. Phytochemistry and pharmacology of anti-depressant medicinal plants: A review. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2018; 104, August 2018, Pages 343-365

Mba I, Nwez EI. Mechanism of *Candida* pathogenesis: revisiting the vital drivers. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases.* 2020; 39: 1797–1819.

Merghni A, Noumi E, Hadded O, Dridi N, Panwar H, Ceylan O, Mastouri M, Snoussi M. Assessment of the antibiofilm and antiquorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* essential oil and its main component 1,8-cineole against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains. *Microb Pathog.* 2018;118: 74-80.

Moumni S, Elaissi A, Trabelsi A, Merghni A, Chraief I, Jelassi B, Chemli R, Ferchichi S. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of some Lamiaceae species essential oils from Tunisia. *BMC Complement Med Ther.* 2020; 20 (1): 103.

Murohy SE, Bicanic T. Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches in Invasive Candidiasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 759408.

Murphy SE, Bicanic T. Drug Resistance and Novel Therapeutic Approaches in Invasive Candidiasis. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11: 759408.

Nicola GG, Lavoie MC. *Streptococcus mutans* et les streptocoques buccaux dans la plaque dentaire. *Canadian Journal of Microbiology.* 2011; 57 (1).

Nobbs AH, Lamont RJ, Jenkinson, HF. Streptococcus adherence and colonization. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2009; 73 (3): 407 - 450.

Nourbakhsh F, Nasrollahzadeh MS, Tajani AS, Soheili V, Hadizadeh F. Bacterial biofilms and their resistance mechanisms: a brief look at treatment with natural agentes. *Folia Microbiologica.* 2022; 67: 535–554.

Odongo E, Mutai PC, Amugune BK, Mungai NN. A Systematic Review of Medicinal Plants of Kenya used in the Management of Bacterial Infections. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2022; 2022: 1-43.

Paiva LCF, Vidigal PG, Donatti L, Svidzinski TIE., Consolaro MEL. Assessment of in vitro biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron.* 2012; 43 (2): 497-502.

Park B, Hwang E, Seo SA, Cho JG, Yang JE, Yi TH. *Eucalyptus globulus* extract protects against UVB-induced photoaging by enhancing collagen synthesis via

regulation of TGF- β /Smad signals and attenuation of AP-1. Arch Biochem Biophys. 2018; 1 (637):31-39.

Park JW, Wendt M, Heo GJ. Antimicrobial activity of essential oil of *Eucalyptus globulus* against fish pathogenic bacteria. Lab Anim Res. 2016; 32 (2): 87–90.

Pereira R, dos Santos Fontenelle RO, de Brito EHS, de Moraes SM. Biofilm of *Candida albicans*: formation, regulation and resistance. Journal of Applied Microbiology. 2020; 131: 11-22.

Perlim DS, Rautemaa-Richardson R, Alastruey-Izquierdo A. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. Lancet Infect Dis. 2017; 17(12): 383-392.

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

Pinheiro RE, Chaves TP, Melo ES, Ali S, ALI Wa, Umer M, Gama GSP, Lira DNS, Souza JSN, Soares MJS, Santos AS, Mota RA, Freitas PR, Afzal MI, Salehi B, Coutinho HDM, Setzer WN, Imran M, Sharifi-Rad J. Modulatory-antibiotic activity of the essential oil from *Eucalyptus citriodora* against MDR bacterial strains. Cell Mol Biol. 2020; 66(4): 60-64.

Rahuman HBH, Dhandapani R, Narayanan S, Palanivel V, Paramasivam R, Subbarayalu R, Thangavelu S, Muthupandian S. Medicinal plants mediated the green synthesis of silver nanoparticles and their biomedical applications. IET Nanobiotechnol. 2022; 16 (4): 115-144.

Ramos LS, Branquinha MH, Santos. Different classes of hydrolytic enzymes produced by multidrug-resistant yeasts comprising the *Candida haemulonii* complex. Medical Mycology, 2017; 55 (2): 228–232.

Rashed AA, Rathi DNG, Nasir NAHA, Rahman AZA. Antifungal Properties of Essential Oils and Their Compounds for Application in Skin Fungal Infections: Conventional and Nonconventional Approaches. *Molecules*. 2021; 26: 1093.

Rasooli I. Dental Biofilm Prevention by *Mentha spicata* and *Eucalyptus camaldulensis* Essential Oils. *International Journal of Infectious Diseases*. 2008; 12: 167.

Rastgou M, Danesh YR, Ercisli S, Sayyed RZ, Enshasy HAE, Dailin DJ, Alfarraj S, Ansari MJ. The Effect of Some Wild Grown Plant Extracts and Essential Oils on *Pectobacterium betavasculorum*: The Causative Agent of Bacterial Soft Rot and Vascular Wilt of Sugar Beet. *Plants (Basel)*. 2022; 11(9): 1155.

Ribeiro FC, Rossoni RD, de Barros PP, Santos JD, Fugisaki LRO, Leão MPV, Junqueira JC. Action mechanisms of probiotics on *Candida* spp. and candidiasis prevention: an update. *Journal of Applied Microbiology*. 2019; 129: 175—185.

Roque FP, Anibal PC, Busato SN, Boni GC, Hofling JF, Queiroz NCA, Foglio MA. In vitro anti-fungal activity of a new compound isolated from *Pterodon pubescens* Benth. *Advancement in Medicinal Plant Research*. 2015; 3: 55-61.

Rybak JM, Cuomo CA, Rogers PD. The molecular and genetic basis of antifungal resistance in the emerging fungal pathogen *Candida auris*. *Current Opinion in Microbiology*. 2022; 70: 102208.

Saghafi F., Mirzaie F., Gorji E., Nabimeybodi R., Fattahi M., Mahmoodian H., Zareshahi R. Antibacterial and anti-*Trichomonas Vaginalis* effects of *Rosa Damascena* mill petal oil (a persian medicine product), aqueous and hydroalcoholic extracts. *BMC Complement Med Ther*. 2021; 21 (1): 265.

Salehi B, Sharifi-Rad J, Quispe C, Liaique H, Villalobos M, Smeriglio A, Trombetta D, Ezzat SM, Salem MA, Zayed A, Castillo CMS, Yazdi SE, Sem S, Acharya K, Sharopov F, Martins N. Insights into *Eucalyptus* genus chemical constituents, biological activities and health-promoting effects. *Trends in Food Science & Technology*. 2019; 91: 609-624.

Satala D, Gonzalez-Gonzalez M, Smolarz M, Surowiec M, Kulig K, Wronowska E, Zawrotniak M, Kozik A, Rapala-Kozik M, Karkowska-Kuleta J. The Role of *Candida albicans* Virulence Factors in the Formation of Multispecies Biofilms With Bacterial Periodontal Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11: 765942.

Septiana S, Bachtiar BM, Yuliana ND, Wijaya CH. Cajuputs candy impairs *Candida albicans* and *Streptococcus mutans* mixed biofilm formation in vitro. *F1000Res*. 2019; 8: 1923.

Shakeri A, Sharifi MJ, Fazly Bazzaz BS, Emami A, Soheili V, Sahebkar A, Asili J (2018) Bioautography detection of antimicrobial compounds from the essential oil of *Salvia pachystachys*. *Curr Bioact Comp* 14:80–85

Sharifi-Rad J, Salehi B, Varoni EM, Sharopov F, Yousaf Z, Ayatollahi AS, Kobarfard F, Sharifi-Rad R, Afdjei MH, Sharifi-Rad M, Iriti M. Plants of the *Melaleuca* Genus as Antimicrobial Agents: From Farm to Pharmacy. *Phytother Res*. 2017;31(10): 1475-1494.

Sharma Y, Rastogi SK, Perwez A, Rizvi MA, Manzoor N. β -citronellol alters cell surface properties of *Candida albicans* to influence pathogenicity related traits. *Med Mycol*. 2020; 58 (1): 93-106

Siddique YH, Mujtaba SF, Jyoti S, Naz F. GC–MS analysis of *Eucalyptus citriodora* leaf extract and its role on the dietary supplementation in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *Food and Chemical Toxicology*. 2013; 55: 29–35.

Silva NC, Nery JM, Dias ALT. Aspartic proteinases of *Candida* spp.: role in pathogenicity and antifungal resistance. *Mycoses*. 2014; 57 (1): 1-11.

Silva WJ, Seneviratne J, Samaranyake LP, Del Bel Cury AA. et al. Bioactivity and architecture of *Candida albicans* biofilms developed on poly (methyl methacrylate) resin surface. *Journal of Biomedical material research*. 2010; 94: 149-156.

Singh H, Bharadvaja N. Treasuring the computational approach in medicinal plant research. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 2021; 164: 19-32.

Staniszewska M. Virulence Factors in *Candida* species. *Current Protein and Peptide Science*, 2020; 21: 313-323.

Stringaro A, Vavala E, Colone M, Pepi F, Mignogna G, Garzoli S, Cecchetti S, Ragno R, Angiolella L. Effects of *Mentha suaveolens* Essential Oil Alone or in Combination with Other Drugs in *Candida albicans*. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014; 2014: 125904.

Sukhikh S, Ivanova S, Babich O, Larina V, Krol O, Prosekov A, Popov A, Kriger O. Antimicrobial Screening and Fungicidal Properties of *Eucalyptus globulus* Ultrasonic Extracts. *Plants*. 2022; 11: 1441.

Taff HT, Mitchell KF, Edward JA, Andes DR. Mechanisms of *Candida* biofilm drug resistance. *Future Microbiol*. 2013; 8 (10): 1-19.

Tolba H, Moghrani H, Benelmouffok A, Kellou D, Maachi R. Essential oil of Algerian *Eucalyptus citriodora*: Chemical composition, antifungal activity. *Journal de Mycologie Médicale*. 2015; 25 (4): 128-133.

Trindade LA, Cordeiro LV, Silva DF, Figueiredo PTR, Pontes MLC, Lima EO, Carvalho AAT. The antifungal and antibiofilm activity of *Cymbopogon nardus* essential oil and citronellal on clinical strains of *Candida albicans*. *Braz J Microbiol*. 2022; 53(3):1231-1240.

Tyagi AK, Malik A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. *Food Chemistry*. 2011; 126 (1): 228-235

Vecchio MG, Loganés C, Minto C. Beneficial and Healthy Properties of *Eucalyptus* Plants: A Great Potential Use. *The Open Agriculture Journal*. 2016; 10: 52-57.

Vieira M, Bessa LJ, Martins MR, Arantes S, Teixeira APS, Mendes A, Costa PM, Belo ADF. Chemical Composition, Antibacterial, Antibiofilm and Synergistic Properties of Essential Oils from *Eucalyptus globulus* Labill. and Seven Mediterranean Aromatic Plants. *Chem Biodivers*. 2017; 14 (6).

Wall G, Montelongo-Jauregui D., Bonifacio B. V., Ribot-Lopez J. L., Uppuluri P. *Candida albicans* biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 2019; 52: 1-6.

Wang W, Xu J, Fang H, Li Z, Li M. Advances and challenges in medicinal plant breeding. *Plant Science*. 2020; 298: 110573.

Wang W, Xu J, Fang H, Li Z, Li M. Advances and challenges in medicinal plant breeding. *Plant Science*. 2020; 298: 1-10

Wijesinghe GK, Oliveira TR, Maia FC, Feiria SB, Barbosa JP, Joia F, Boni GC, Höfling JF. Efficacy of true cinnamon (*Cinnamomum verum*) leaf essential oil as a therapeutic alternative for *Candida* biofilm infections. *Iran J Basic Med Sci*. 2021; 24 (6): 787-795.

Zaynab M, Fatima M, Abbas S, Sharif Y, Umai M, Zafar MH, Bahadar K. Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial Pathogenesis*. 2018; 124: 198-202.

Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Ver*. 2013; 26:781–791.

Zeng Y, Fadaak A, Alomeir N, Wu TT, Rustchenko E, Qing S, Bao J, Gilbert C, Xiao J. *Lactobacillus plantarum* Disrupts *S. mutans* – *C. albicans* Cross-Kingdom Biofilms. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022; 12: 872012.

Zonfrillo M, Andreola F, Krasnowska EK, Sferrazza G, Pierimarchi P, Serafino A. Essential Oil from *Eucalyptus globulus* (Labill.) Activates Complement Receptor-Mediated Phagocytosis and Stimulates Podosome Formation in Human Monocyte-Derived Macrophages. *Molecules*. 2022; 27 (11): 3488.

Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. 2011; 18 (13): 1181-1190.

ANEXOS

ANEXO 1 – Certificado Comitê de Ética



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação da atividade antifúngica de óleos essenciais anti cepas padrão e isolados clínicos orais de *Candida spp*", CAAE 79399017.0.0000.5418, dos pesquisadores Janaina Priscila Barbosa, Anderson Laerte Teixeira e José Francisco Höfling, satisfaz as exigências das resoluções específicas sobre ética em pesquisa com seres humanos do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde e foi aprovado por este comitê em 08/12/2017.

The Research Ethics Committee of the Piracicaba Dental School of the University of Campinas (FOP-UNICAMP) certifies that research project "Evaluation of the antifungal activity of essential oils anti standard strains and clinical isolates of *Candida spp*", CAAE 79399017.0.0000.5418, of the researcher's Janaina Priscila Barbosa, Anderson Laerte Teixeira and José Francisco Höfling, meets the requirements of the specific resolutions on ethics in research with human beings of the National Health Council - Ministry of Health, and was approved by this committee on the 8th of December of 2017.

Prof. Fernanda Miori Pascon
 Vice Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Jacks Jorge Junior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo e a lista de autores aparecem como fornecidos pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title and the list of researchers of the project appears as provided by the authors, without editing.

ANEXO 2 – Receita do fixador Karnovsky

Imersão

- Volume final da solução = 100mL.
- Concentração do paraformaldeído = 4% e do glutaraldeído 2,5%.

1. Em um becker de vidro, aquecer 40mL de água destilada entre 60-70°C usando agitador magnético com aquecimento.
2. Dissolver 4g de paraformaldeído nos 40mL de H₂O destilada a 60-70°C, dentro da capela de exaustão (becker deve ficar tampado com papel alumínio, a temperatura monitorada com termômetro)
3. Manter leve agitação por 5 minutos
 - a. Cuidado para não tocar o termômetro na pulga do agitador magnético
4. Adicionar 2 a 6 gotas de NaOH 1N para clarear a solução (solução do pHmetro)
5. Deixar a solução esfriar dentro da capela, em temperatura ambiente
6. Adicionar 10mL de glutaraldeído 25% (específico para microscopia eletrônica, ampolas armazenadas a 4°C)
7. Completar o volume da solução para 100mL usando tampão fosfato de Sorensen 0,2M (ATENÇÃO: 0,2M = sol. A + sol. B, sem adição de água)
8. Ajustar o pH para 7,2-7,4
9. Armazenar a solução a 4°C

Perfusão (diluir o tampão de imersão 1x)

1. Misturar 1 volume do fixador de imersão com 1 volume de tampão fosfato de Sorensen 0,1M.
 - Concentração do paraformaldeído = 2% e do glutaraldeído 1,25%.

Referência: Karnovsky, MJ. J. Cell Biol. 27 (2) 137^a, 1965.

ANEXO 3 – Receita do tampão Sorensen

TAMPÃO FOSFATO DE SORENSEN

Soluções de estoque (0,2M)

Solução A (0,2M)

Na₂H₂PO₄.H₂O (fosfato de sódio monobásico)13,9gH₂O destilada q.s.p.500mL

Armazenar a 4°C

Solução B (0,2M)

Na₂HPO₄ anidro (fosfato de sódio bibásico anidro)14,19gH₂O destilada q.s.p.500mL

Armazenar a temperatura ambiente

Solução a 0,2M: (sol A: 2,3mL+sol B: 7,7mL=10mL)

Solução de uso (0,1M)

Solução A23mL

Solução B77mL

Ajustar o pH para 7,2 a 7,4 e completar com H₂O destilada q.s.p.200mL

ANEXO 4 – Preparo da solução de Tetróxido de Ósmio

PREPARO DE TETRÓXIDO DE ÓSMIO 2%

[] estoque = 2%

[] uso = 1%

Preparo de 1g de tetróxido de ósmio (O_2O_4) = 50mL de água destilada = solução de O_2O_4 a 2%

1. Medir cerca de 75mL de água destilada, colocar em um becker e ferver
2. Retirar a água do aquecedor e esperar esfriar um pouco
3. Medir 50mL desta água fervida e colocar em um frasco de vidro com tampa de rosca
4. Pegar a ampola de O_2O_4 da geladeira e lavar cuidadosamente com detergente e água corrente, depois passar água destilada (usar LUVAS nitrílica)
5. Secar a ampola com papel higiênico (macio)
6. Na CAPELA de exaustão, usando EPIs (luva nitrílica, máscara, avental e óculos), quebrar a ampola com auxílio de gaze
7. Colocar as duas partes da ampola no frasco contendo a água previamente fervida
8. Tampar o frasco, vedar a tampa com parafilm, envolvê-lo em papel alumínio e deixar na capela de exaustão por 18 horas (overnight)
9. Agitar o frasco com a ampola de vez e quando usando a mão
10. No dia seguinte, ver se os cristais de O_2O_4 dissolveram por completo
11. Preparar frascos de vidro âmbar com tampa para alicotar a solução estoque ([] 2%), identificá-los corretamente com a data e volume da solução
12. Antes de aliquotar a solução, retirar o papel alumínio que envolve o frasco e ver se a solução está cor "amarelo clara" (cor recomendada), não deve estar acastanhada
13. Dentro da capela de exaustão, e com EPIs, aliquotar diferentes volumes da solução estoque: 2mL; 5mL e 10mL
14. Fechar bem os frascos e armazená-los no freezer ($-20^{\circ}C$) por tempo indeterminado
15. Usando EPIs, lavar a vidraria apenas com água e descartar a primeira água em descarte de O_2O_4 , colocar o mesmo volume de óleo de milho dentro do descarte
16. Deixar a vidraria "vertida" em papel toalha dentro da capela até secar
17. Lavar novamente todos os frascos com água e sabão na pia. Deixar secar em bandeja e guardar

Obs: Solução de uso do O_2O_4 (1%): diluir em mesmo volume (1:1) do tampão fosfato de Sorensen (0,1M-solução de uso).

ANEXO 5 – Receita da Resina Dr Spurr

COMPOSIÇÃO DA RESINA DE DR. SPURR (kit # 14300, EMS) UTILIZADA EM INCLUSÃO DE AMOSTRAS PARA MET

Volume total: 10,825mL

Obs: Dentro da capela de exaustão e equipado com EPI, adicionar, com ajuda de seringa graduada descartável, os reagentes em um Becker (25 mL) completamente seco, seguindo a ordem abaixo:

1. ERL 42212,5 mL
2. DER 7362,0 mL
3. NSA6,25 mL

- Agitar os reagentes durante 10 minutos usando agitador magnético, dentro da capela de exaustão.

4. DMAE75 µL

- Após acrescentar DMAE aos componentes acima, agitar por mais 10 minutos, dentro da capela (descartar a ponteira no frasco de descarte da resina)
- Desligar o agitador e deixar a resina descansar (em repouso) por 10 minutos, à temperatura ambiente, antes de utilizá-la.

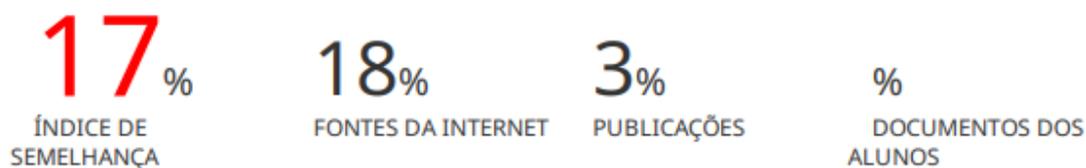
5. Separe a resina em dois frascos

- 5mL em frasco de penicilina (usar seringa graduada para medir), identifique o frasco como 1:1
- 5,75 mL deixe no próprio becker, identifique esse como 3:1 (apenas faça a diluição com acetona no momento do uso)

ANEXO 6 – Relatório de similaridade Turnitin

Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Eucalyptus globulus* contra bactérias orais e fungos do gênero *Candida*.

RELATÓRIO DE ORIGINALIDADE



FONTES PRIMÁRIAS

1	repositorio.unicamp.br Fonte da Internet	16%
2	idoc.pub Fonte da Internet	1%

Excluir citações	Em	Excluir correspondências	< 1%
Excluir bibliografia	Em		