

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Anne Lima de Lara

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E
CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon martinii*
FRENTE A *Staphylococcus aureus***

Santa Maria, RS
2023

Anne Lima de Lara

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E
CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon martinii* FRENTE A
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas**.

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos
Co-orientador: Leonardo Quintana Soares Lopes

Santa Maria, RS
2023

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Lara, Anne Lima de

Avaliação da atividade antimicrobiana, antibiofilme e citotoxicidade do óleo essencial de *Cymbopogon martinii* frente a *Staphylococcus aureus* / Anne Lima de Lara.- 2023.

44 p.; 30 cm

Orientador: Roberto Christ Vianna Santos

Coorientador: Leonardo Quintana Soares Lopes

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2023

1. *Cymbopogon martinii* 2. Biofilme 3. *Staphylococcus aureus* 4. Atividade antimicrobiana e antibiofilme 5. Palmarosa I. Santos, Roberto Christ Vianna II. Lopes, Leonardo Quintana Soares III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, ANNE LIMA DE LARA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Anne Lima de Lara

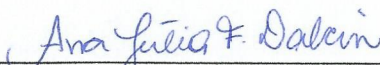
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E
CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon martinii* FRENTE A
*Staphylococcus aureus***

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Farmacêuticas.**

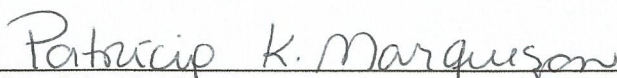
Aprovada em 10 de maio de 2023.



Roberto Christ Vianna Santos, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Ana Júlia Figueiró Dalcin, Dra. (UFN)



Patrícia Kolling Marquazan, Dra. (UFSM)

Santa Maria, RS
2023

Dedico este trabalho aos meus pais, Lizane e Edson, que sempre me deram apoio, incentivo e, principalmente, amor.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho não seria possível sem a colaboração e apoio de diversas pessoas.

Agradeço a todas, e em especial:

- ao professor Roberto Christ Vianna Santos, pela oportunidade e ensinamentos;
- ao meu coorientador Leonardo Quintana Soares Lopes, por todo o auxílio e conselhos;
- aos meus pais, Edson e Lizane, e ao meu irmão Arthur, por me apoiarem em cada decisão, me ajudarem a crescer em cada passo e pelo amor incondicional;
- a minha colega e amiga Andressa, pela parceria, mates, risadas, preocupações e conquistas compartilhadas;
- aos demais colegas e ICs do LAPEMICRO, em especial à Ticiane Pinheiro, pelo auxílio e por deixarem os dias mais divertidos;
- à CAPES pela bolsa de estudos.

Agradeço, também, ao laboratório de caracterização, especialmente ao Prof. Roger Wagner, ao Lablbio, especialmente à Prof^a Daniela Rosa Leal e Jean Lucas da Silva, e ao grupo de pesquisa da Prof^a Michele Sagrillo, especialmente à Aline Rossato e Walter Paixão.

RESUMO

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIBIOFILME E CITOTOXICIDADE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Cymbopogon martinii* FRENTE A *Staphylococcus aureus*

AUTORA: Anne Lima de Lara

ORIENTADOR: Roberto Christ Vianna Santos

CO-ORIENTADOR: Leonardo Quintana Soares Lopes

O biofilme é caracterizado como uma comunidade de microrganismos aderida a uma superfície, que confere as células microbianas proteção contra agentes externos, se caracterizando como uma importante forma de resistência. Em hospitais representam grande parte das infecções relacionadas a cateteres e outros dispositivos médicos invasivos. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria Gram positiva oportunista, comumente presente na pele e fossas nasais de indivíduos saudáveis, que pode causar desde infecções leves a sepse, sendo mais encontrada em infecções de pele, e frequentemente em infecções nosocomiais, que possui ainda, capacidade de formação de biofilme. Atualmente, a multirresistência de *S. aureus* a antimicrobianos leva a busca de alternativas para o tratamento de infecções e, nesse contexto, está o óleo essencial de Palmarosa (*Cymbopogon martinii*). É uma planta proveniente da Índia, e seu óleo essencial é amplamente utilizado na indústria de cosméticos e perfumaria. Apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, apresentando grande potencial antibiofilme. Portanto, esse trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antimicrobiano, antibiofilme e a toxicidade *in vitro* do óleo essencial de *C. martinii* com ênfase em *S. aureus*. Para isso, foi realizada a caracterização do óleo essencial, cujo principal composto detectado foi o geraniol (83,8%), e as técnicas de disco-difusão; microdiluição (concentração inibitória e bactericida mínima); formação e tratamentos dos biofilmes; determinação da biomassa do biofilme; quantificação de células viáveis no biofilme; e cinética de atividade em biofilme formado. Os resultados demonstram uma ação significativa na redução do biofilme de *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 e isolados clínicos), bem como de *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). Além disso, a segurança também foi avaliada, através dos ensaios de MTT, óxido nítrico, DCFH-DA e *Picogreen*, que se mostraram sugestivos de toxicidade em fibroblastos, queratinócitos e células mononucleares de sangue periférico.

Palavras-chave: *Cymbopogon martinii*. *Staphylococcus aureus*. Biofilme. Atividade antibacteriana e antibiofilme. Citotoxicidade. Palmarosa.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY, ANTIBIOFILM AND CYTOTOXICITY OF THE ESSENTIAL OIL OF *Cymbopogon martinii* AGAINST *Staphylococcus aureus*

AUTHOR: Anne Lima de Lara

ADVISOR: Roberto Christ Vianna Santos

CO-ADVISOR: Leonardo Quintana Soares Lopes

The biofilm is characterized as a community of microorganisms adhered to a surface, which gives microbial cells protection against external agents, characterizing itself as an important form of resistance. In hospitals, they represent a large part of infections related to catheters and other invasive medical devices. *Staphylococcus aureus* is an opportunistic Gram-positive bacterium, commonly present in the skin and nasal cavities of healthy individuals, which can cause from mild infections to sepsis, being more found in skin infections, and frequently in nosocomial infections, and also has the ability to form of biofilm. Currently, the multidrug resistance of *S. aureus* to antimicrobials leads to the search for alternatives for the treatment of infections and, in this context, is the essential oil of Palmarosa (*Cymbopogon martinii*). It is a plant from India, and its essential oil is widely used in the cosmetics and perfumery industry. It has antibacterial and antifungal activity, with great antibiofilm potential. Therefore, this work aimed to evaluate the antimicrobial effect, antibiofilm and in vitro toxicity of the essential oil of *C. martinii* with emphasis on *S. aureus*. For this, the characterization of the essential oil was carried out, whose main compound detected was geraniol (83.8%), and the disc-diffusion techniques; microdilution (minimum inhibitory and bactericidal concentration); formation and treatment of biofilms; determination of biofilm biomass; quantification of viable cells in the biofilm; and activity kinetics in formed biofilm. The results demonstrate a significant action in reducing the biofilm of *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213 and clinical isolates), as well as *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 51299) and *Streptococcus mutans* (ATCC 25175). In addition, safety was also evaluated through MTT, nitric oxide, DCFH-DA and Picogreen assays, which proved to be suggestive of toxicity in fibroblasts, keratinocytes, and peripheral blood mononuclear cells.

Keywords: *Cymbopogon martinii*. *Staphylococcus aureus*. Biofilm. Antimicrobial and antibiofilm activity. Cytotoxicity. Palmarosa

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Inflorescência de Palmarosa.....	18
Figura 2 – Estrutura química do geraniol.....	19
Figura 3 – Destruição do biofilme formado de <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> (29213 e IC 39 e 92) e <i>S. mutans</i>	29
Figura 4 - Resultados da inibição do biofilme de <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> (29213 e IC 39 e 92) e <i>S. mutans</i>	31
Figura 5 - Resultado da quantificação de células viáveis no biofilme de <i>S. aureus</i> após tratamento.....	32
Figura 6 – Resultado da cinética de atividade em biofilme formado de <i>S. aureus</i>	33
Figura 7 - Resultados dos ensaios de MTT, óxido nítrico (ON), 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e <i>Picogreen</i> (PG).....	34
Figura 8 – Resultados do ensaio de MTT com as linhagens L929 e HCAT.....	35

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Resultados da análise qualitativa dos compostos por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa e da análise do perfil dos componentes do óleo essencial de <i>C. martinii</i>	27
TABELA 2 – Resultados do ensaio de disco-difusão.....	28
TABELA 3 – Resultados de CIM e CBM.....	29

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	11
2.1 OBJETIVO GERAL	11
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	11
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
3.1 BIOFILME	12
3.2 MICRORGANISMOS	13
3.2.1 <i>Escherichia coli</i>	13
3.2.2 <i>Enterococcus faecalis</i>	14
3.2.3 <i>Staphylococcus aureus</i>	15
3.2.4 <i>Streptococcus mutans</i>	16
3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS	16
3.4 <i>Cymbopogon martinii</i>	17
3.4.1 Geraniol	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.2 ÓLEO ESSENCIAL	20
4.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE <i>C. martinii</i>	20
4.4 DISCO-DIFUSÃO	21
4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)	21
4.6 FORMAÇÃO E TRATAMENTO DO BIOFILME	22
4.7 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME	22
4.8 DOSAGEM DA BIOMASSA DO BIOFILME	22
4.9 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NO BIOFILME	23
4.10 CINÉTICA DE ATIVIDADE EM BIOFILME FORMADO	23
4.11 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITO-GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs)	24
4.11.1 Cultura de células e tratamentos	24
4.11.2 Ensaio de MTT	24
4.11.3 Ensaio de óxido nítrico	25
4.11.4 Ensaio de DCFH-DA	25
4.11.5 Ensaio de Picogreen	26

4.12 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA CITOTOXICIDADE EM FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS	26
4.12.1 Linhagens celulares	26
4.12.2 Ensaio de citotoxicidade	26
4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	27
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
6 CONCLUSÃO	36
REFERÊNCIAS.....	37

1 INTRODUÇÃO

A maior parte das infecções microbianas são causadas por biofilmes patogênicos e a proteção fornecida por ele torna a infecção mais difícil de ser eliminada (GULATI; NOBILE, 2016). Nas últimas décadas, os biofilmes têm sido alvo de diversos estudos devido ao interesse na formação dessa comunidade multicelular e a alta resistência a antimicrobianos e ao sistema imune (HARMSSEN et al., 2010).

Os biofilmes são responsáveis por muitas infecções nosocomiais, sendo grande parte delas causadas por dispositivos médicos ou implantes, como marcapasso, lentes de contato e cateteres urinários (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013). Dentre as diversas etapas de formação do biofilme destaca-se a adesão inicial a uma superfície e a ligação intercelular (HENRIQUES; VASCONCELOS; CERCA, 2013).

A bactéria Gram positiva *Staphylococcus aureus* está presente na microbiota normal de indivíduos saudáveis, principalmente nas fossas nasais e trato genital feminino e gastrointestinal, porém, também é responsável por infecções de pele, pneumonia, intoxicações alimentares, sepse e até morte, e apresenta grande capacidade de formar biofilme, sendo muito presente em infecções hospitalares (LOWY, 1998). Em Unidades de Tratamento Intensivo (UTIs) é o segundo microrganismo mais isolado em infecções de corrente sanguínea (ANVISA, 2022).

Aliado a isso, a significativa capacidade de resistência do *S. aureus* aos antimicrobianos gera a necessidade de encontrar alternativas para o tratamento de infecções causadas por ele, sendo assim, a busca por compostos naturais, como os óleos essenciais, tem se tornado uma alternativa para contornar esse problema (WIŃSKA et al., 2019; GUO et al., 2022).

Nesse contexto, o óleo essencial de *Cymbopogon martinii*, popularmente conhecido como Palmarosa, se apresenta como uma opção para o tratamento dessas infecções. O óleo é rico em geraniol e muito utilizado pela indústria cosmética, tem sido estudado em relação as suas propriedades antifúngicas e antibacterianas, representando futuras possibilidades terapêuticas importantes associado a biofilmes (ANDRADE et al., 2014). Apesar disso, até o momento, não foram realizados muitos estudos para verificar sua potencial atividade antibiofilme.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antimicrobiana e antibiofilme *in vitro* do óleo essencial de *Cymbopogon martinii* contra *Staphylococcus aureus*, bem como verificar sua citotoxicidade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a caracterização (composição percentual) do óleo essencial de *C. martinii*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. martinii* contra *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. mutans*;
- Verificar o efeito antibiofilme do óleo essencial de *C. martinii* contra *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. mutans*;
- Analisar a cinética de atividade antibiofilme do óleo essencial de *C. martinii* contra *S. aureus*;
- Determinar a capacidade de *C. martinii* de destruir biofilmes de *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. mutans* já formados;
- Determinar a capacidade de *C. martinii* de inibir a formação dos biofilmes de *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* e *S. mutans*;
- Avaliar a segurança do uso do óleo essencial de *C. martinii*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 BIOFILME

Os microrganismos são seres presentes em diversos habitats, e são capazes de desenvolver complexos e variados comportamentos (COSTERTON; STEWART; GREENBERG, 1999). Na forma livre (planctônica), os microrganismos encontram-se em suspensão e vivem isoladamente, enquanto, na forma séssil, podem ser encontrados aderidos a superfícies sob a forma de biofilmes (STOODLEY et al., 2002). Biofilme pode ser definido como uma comunidade complexa de microrganismos aderida a uma superfície biótica ou abiótica envolvida por uma matriz polimérica, produzida por eles mesmos como uma forma de proteção às defesas do hospedeiro e aos agentes terapêuticos (DUNNE, 2002; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; RABIN et al., 2015). Há várias vantagens para os microrganismos quando estão na forma de biofilme se comparados aos seus homólogos de vida livre, dentre elas está o fato de os agregados de microrganismos apresentarem maior disponibilidade de nutrientes, interferindo nas taxas de crescimento, cooperatividade metabólica e proteção aos fatores externos (BEHLAU; GILMORE, 2008; HUANG et al., 2020).

Os biofilmes podem ser monomicrobianos, constituídos por uma única espécie, ou por comunidades derivadas, formadas por várias espécies bacterianas, fungos, leveduras, algas e outros organismos celulares (polimicrobiano) (SAUER; RICKARD; DAVIES, 2007). Quando ocorre o crescimento de biofilme polimicrobiano, uma espécie pode ser favorecida pela presença da outra em uma interação chamada de comensalismo, melhorando a degradação de compostos orgânicos em comparação com as monoculturas (NIKOLAEV; PLAKUNOV, 2007). No entanto, os microrganismos representam menos de 10% do biofilme (SATPATHY et al., 2016). Os biofilmes são compostos também pelas substâncias poliméricas extracelulares (EPS) ou matriz exopolissacarídica e por quaisquer outros resíduos do ambiente colonizado, além de proteínas, lipídeos, DNA, RNA, íons e água, formando uma estrutura porosa e altamente hidratada (BEHLAU; GILMORE, 2008).

O biofilme inicia-se com a aderência microbiana à superfície, e este processo é condicionado à interferência de fatores biológicos (como o crescimento das células microbianas e sua divisão, produção e excreção de EPS) e fatores não biológicos. Entre os fatores não biológicos são reconhecidas as interações químicas como as

forças de Van der Waals, interações hidrofóbicas, eletrostáticas e ligações de hidrogênio que ocorrem entre as macromoléculas. Este estágio inicial de adesão, em que há envolvimento de interações físico-químicas entre as superfícies, designa-se adesão primária (WATNICK; KOLTER, 2000). Em um segundo estágio, os microrganismos são levemente aderidos a superfície, induzindo distintas fases de crescimento e intensa divisão celular (FLEMMING et al., 2000). O processo de adesão é concretizado com a produção de exopolissacarídeos, formando complexos com os materiais da superfície na qual aderem e/ou através de receptores específicos localizados na superfície das paredes celulares (caracterizando a adesão secundária) (SUTHERLAND, 1997). Em seguida inicia o processo de maturação do biofilme, formado por microrganismos que são interceptados por canais de água que permitem a entrada dos nutrientes. Ao final deste processo, o biofilme atinge uma massa crítica, sendo estabelecido um equilíbrio dinâmico no qual o crescimento de células é compensado pela liberação de células planctônicas disponíveis para a colonização de outras superfícies formando novos biofilmes (DUNNE, 2002; COSTERTON; MONTANARO; ARCIOLA, 2005).

Uma vez instalado o biofilme como uma estratégia de sobrevivência para os microrganismos, este então fornece vantagens importantes como menor exposição a carências nutricionais, radicais de oxigênio e antimicrobianos; mudanças de pH; abrigo de predação; e manutenção das atividades de enzimas extracelulares. Além de ocorrer uma resistência aumentada à fagocitose (KEREN et al., 2004; FUX et al., 2005; O'GARA, 2007; FUCHS et al., 2010).

3.2 MICRORGANISMOS

3.2.1 *Escherichia coli*

Consiste em um Gram negativo presente na microbiota normal do intestino grosso, que auxilia na produção de algumas vitaminas, digestão de alimentos e realiza antagonismo microbiano (bacteriocinas contra *Salmonella* e *Shigella*), porém linhagens como O157:H7 causam diarreia sanguinolenta e geram um grande problema de saúde pública. Tem como características: anaerobiose facultativa, oxidase negativa, produção de gás a partir da lactose, motilidade e catalase positiva. Sendo feita a diferenciação da linhagem comensal e patogênica através do

carboidrato sorbitol (a linhagem O157:H7 não realiza essa fermentação, ao contrário da comensal) (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; JANG et al., 2017).

Isolados de *E. coli* entero-hemorrágica apresenta a toxina Shiga, causadora de desinteria tipo *Shigella* (colite hemorrágica e síndrome hemolítico-urêmica), além disso também é responsável pela doença conhecida como diarreia do viajante, infecções urinárias (cistite e pielonefrite), meningite e sepse (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Outra importante função da *E. coli* não-patogênica está na engenharia genética, onde é empregada na produção de diversos produtos como fator estimulador de colônia (CSF), fator de crescimento epidérmico (EGF), Interferon alfa e gama, hormônio do crescimento humano (hGH), insulina, uroquinases, relaxina, e fator de necrose tumoral (TNF). Além de seu uso para identificação de contaminação fecal na água (KAPER; NATARO; MOBLEY, 2004; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012; JANG et al., 2017).

De acordo com o Ministério da Saúde (2019), é o principal microrganismo causador de doenças transmitidas por alimentos e o segundo mais isolado em infecções do trato urinário em UTI adulto no RS (ANVISA, 2022).

3.2.2 *Enterococcus faecalis*

Coco Gram positivo, encontrado na microbiota do trato gastrointestinal (principalmente intestino), canal vaginal e cavidade oral. Apresenta resistência natural a penicilina e alta resistência a diversos antibióticos. Tem habilidade de sobreviver em ambientes pobres em nutrientes, hipotônicos, hipertônicos, ácidos ou alcalinos e em temperaturas de 10 a 45 °C (HUYCKE; SAHM; GILMORE, 1998; KIM; ROSA; MIN, 2020).

Por ser viável em canais radiculares, é um dos principais microrganismos isolados em canais radiculares e causador de insucessos endodônticos. Além disso, também é encontrado em lesões nas mucosas de pacientes imunocomprometidos (SABER; EL-HADY, 2012).

Devido a sua persistência nas mãos, jogos de cama e gases fecais, são comumente associados a infecções nosocomiais, sendo responsáveis por infecções em feridas cirúrgicas e do trato urinário, e entram na corrente sanguínea através de cateteres (TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

3.2.3 *Staphylococcus aureus*

S. aureus é uma bactéria Gram positiva, colônias de cor amarelada, anaeróbia facultativa, com genoma cromossômico circular, produtora de catalase, com resultado positivo para os testes de coagulase, fermentação do ágar Manitol e formação de ácido a partir da glicose, sendo encontrada em cerca de 30% da população (LOWY, 1998; WERTHEIM et al., 2005; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012). Sua parede celular é composta por 50% de peptidoglicano, e possui proteínas de superfície, como a proteína A que apresenta propriedades antifagocitárias que são baseadas na sua habilidade de se ligar a porção Fc das imunoglobulinas (LOWY, 1998).

As toxinas produzidas por essa bactéria induzem alterações pró-inflamatórias, dano celular (podendo levar a sepse), proliferação de linfócitos T e liberação de citocinas, eritema e separação de pele (síndrome da pele escaldada), um exemplo disso é a toxina leucocidina, que é responsável pela destruição das células brancas. Além disso, produzem enzimas como protease, lipase e hialuronidase, que são responsáveis pela destruição de tecidos e disseminação da infecção (LOWY, 1998; TORTORA; FUNKE; CASE, 2012).

Apesar de ser uma bactéria comensal, colonizando as narinas, pelo, trato urogenital feminino e gastrointestinal, também é responsável por diversas infecções, como na pele (impetigo e foliculite, por exemplo), bacteremia (principalmente em pacientes com mais de 50 anos, com doença cardíaca, neurológica ou respiratória), endocardite (mais comum em usuários de drogas, pacientes idosos, com válvulas protéticas e hospitalizados), infecções metastáticas (recorrente nos ossos, articulações, rins e pulmões), pneumonia, intoxicações alimentares (enterotoxina que causa vômitos e náusea quando ingerida), infecções em feridas cirúrgicas, sepse, e síndrome do choque tóxico (LOWY, 1998; TORTORA, FUNKE; CASE, 2012; FITZGERALD, 2014; KWIECINSKI; HORSWILL, 2020). No Rio Grande do Sul, é o segundo microrganismo mais prevalente em infecções primárias de corrente sanguínea em UTI adulto e pediátrico (ANVISA, 2022).

O uso irracional de antimicrobianos após a sua descoberta no século XX levou ao surgimento da resistência bacteriana, adquirida principalmente por genes codificantes, como *vanA*, *mecA* e *mecC*, e plasmídeos, exemplo a penicilinase, que hidrolisa o anel beta-lactâmico da penicilina (LEE et al, 2018; GUO et al., 2022). A habilidade de adquirir resistência a qualquer antimicrobiano apresentada pelo *S.*

aureus, incluindo os beta-lactâmicos (MRSA), vancomicina (VRSA) e penicilina, leva a uma grande dificuldade no tratamento desse microrganismo, tornando-se um apelo a busca de alternativas eficazes para combater tais infecções (LEE et al, 2018; GUO et al., 2022).

3.2.4 *Streptococcus mutans*

É o principal microrganismo causador da doença cárie, capaz de metabolizar uma variedade maior de carboidratos do que outras bactérias Gram positivas. Realiza a fermentação do manitol, sorbitol, insulina, esculina, melibiose e rafinose (LEMOS et al., 2019).

De acordo com Hamilton e Buckley (1991), quando tem crescimento prolongado em ambientes ácidos, como em fissuras ou lesões de cárie, altera a fisiologia celular, conferindo maior acidez.

Além disso, segundo Tong et al. (2011), em condições de inanição tem resistência aumentada a agentes anti-cárie (fluoreto de sódio e acetato de clorexidina) e níveis letais de ácido.

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas pelo homem ao longo de toda a história pela própria necessidade humana, uma vez que as plantas foram os primeiros recursos terapêuticos utilizados no tratamento e cura de enfermidades. As antigas civilizações utilizavam as plantas medicinais muito antes de aparecer qualquer forma de escrita, algumas como alimentos e outras como medicamentos (DORTA, 1998). Nas antigas civilizações, os primeiros registros datam de 1500 a.C. quando foi escrito o manuscrito egípcio “Papiro de Ebers”, considerado um dos mais importantes livros da cultura médica. Neste livro foram citados cerca de 700 tratamentos diferentes, incluindo extratos de plantas, metais (como cobre e chumbo) e venenos de animais. A partir deste manuscrito o velho mundo tomou ciência de uma Farmacopéia egípcia contendo diversas espécies vegetais, algumas delas utilizadas por fitoterapeutas até hoje (ALMEIDA, 1993; ELDIN; DUNFORD, 2001).

Os óleos essenciais são substâncias secundárias à base de plantas, voláteis, naturais e complexos, encontrados principalmente nas flores, raízes, sementes, frutos

e casca, sendo responsável pelo aroma, defesa contra patógenos, microrganismos e predadores, bem como atração de polinizadores (BAKKALI et al., 2008; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014; HOFFMANN, 2020). São conhecidos por suas propriedades bactericida, fungicida, analgésica, sedativa, anti-inflamatória, anestésica e espasmolítica (BAKKALI et al., 2008).

Historicamente, têm sido usados na medicina tradicional, cerimônias religiosas, cosméticos e aromaterapia em países como Egito, China e Índia. Devido a isso e a diversas preocupações ambientais como uso de pesticidas e drogas sintéticas, o interesse em óleos essenciais tem aumentado (HOFFMANN, 2020).

A extração do óleo pode ser feita de diversas maneiras, entre elas, destilação (a vapor, hidrodestilação e hidrodifusão), por solvente (dióxido de carbono supercrítico e água subcrítica), e micro-ondas sem solvente (TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

A composição química dos óleos essenciais consiste em dois grupos os hidrocarbonetos de terpeno (componente mais comum nos óleos essenciais) e compostos aromáticos (BAKKALI et al., 2008; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

Os terpenos são formados a partir de várias combinações de isoprenos e possuem baixo peso molecular. As principais estruturas formadas são: álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, éteres, peróxidos e fenóis. Os compostos aromáticos são derivados do fenilpropano e são compostos por aldeídos, álcoois, fenóis, derivados metoxi, e compostos de metileno dioxi (BAKKALI et al., 2008; TONGNUANCHAN; BENJAKUL, 2014).

De acordo com Wińska et al. (2019), as bactérias Gram positivas apresentam maior susceptibilidade a ação dos óleos essenciais, e a atividade antimicrobiana desses compostos está relacionada aos grupos fenólicos, alcóolicos e aromáticos. Devido a sua alta volatilidade, seu tempo de ação é limitado, apesar disso, sua baixa toxicidade e origem natural, tornam interessante seu uso, tanto como medicamento, como nas indústrias de alimentos e cosméticos.

3.4 *Cymbopogon martinii*

C. martinii, popularmente conhecida como Palmarosa (figura 1), é uma planta nativa da Ásia, principalmente Índia e Paquistão. Seus constituintes principais incluem

geraniol, acetato de geranila e β -cariofileno (PRASHAR et al., 2003; SCHERER et al., 2009).

Figura 1 – Inflorescência de Palmarosa



Fonte: (DUBEY; MALLAVARAPU; LUTHRA, 2000)

A Palmarosa apresenta duas variedades: *motia* e *sofia*, que visualmente possuem poucas diferenças, porém o óleo da var. *motia* apresenta um odor mais fino em relação a *sofia*, sendo a mais usada na produção de óleos essenciais. As principais partes da planta utilizadas são os talos, folhas e flores, cada um deles gerando cerca de 0,04%, 1,32% e 1,71% de óleo, respectivamente (GUENTHER, 1950). Além disso, a var. *motia* prefere um clima seco, com solo bem drenado de composição basáltica, enquanto a var. *sofia* cresce melhor em solo mais úmido e baixas altitudes (GUENTHER, 1950).

O óleo de Palmarosa tem importância comercial e é usado em perfumes, cosméticos, comidas e bebidas, farmácia e aromaterapia, principalmente devido ao seu forte aroma proveniente de compostos voláteis complexos presentes nos metabolitos da planta (DUBEY; MALLAVARAPU; LUTHRA, 2000; ANDRADE et al., 2014). Na aromaterapia o óleo é usado como tônico de pele, em virtude da sua propriedade antibacteriana e qualidade anti-inflamatória (ANDRADE et al., 2014).

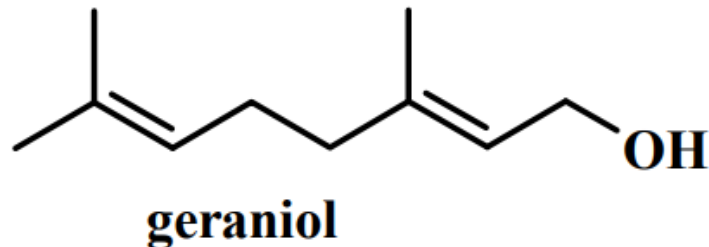
Além dos usos cosméticos, o óleo essencial de Palmarosa possui ação antifúngica e repelente. Além disso, pode ser uma opção de agente inibidor de biofilme, visto que possuem ação contra bactérias (SCHERER et al., 2009).

3.4.1 Geraniol

É um álcool monoterpêno acíclico (3,7-dimetil-octa-trans-2,6-dien-1-ol), com odor floral, doce, com um leve toque cítrico e de rosas, um óleo amarelo claro não solúvel em água, é um importante constituinte de mais de 250 óleos essenciais (CHEN; VILJOEN, 2010; MAÇZKA; WIŃSKA; GRABARCZYK, 2020).

O geraniol (figura 2) apresenta atividades anti-proliferação e anti-migração de tumores, antioxidante, anti-inflamatória, efeito hepatoprotetivo, antimicrobiana, anti-helmíntico, atividade cardioprotetora, efeito neuroprotetor, proteção contra úlceras em mucosa gástrica e duodenal, entre outros. Além disso, também apresenta efeito repelente e inseticida, e foi demonstrada atividade como potencializador natural para melhorar a penetração cutânea de 5-fluorouracil, diclofenaco sódico e sulfadiazina de prata (CHEN; VILJOEN, 2010; LEI et al., 2018; MAÇZKA; WIŃSKA; GRABARCZYK, 2020).

Figura 2 – estrutura química do geraniol



Fonte: (MAÇZKA; WIŃSKA; GRABARCZYK, 2020)

Apesar de seu elevado consumo, a extração desse componente das plantas é restrita, por isso, estudos foram realizados para identificar um método efetivo de biossíntese de geraniol, se destacando a produção de geraniol em *Saccharomyces cerevisiae* com expressão de geraniol sintase e arnesil difosfato sintase (LEI et al., 2018).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MICRORGANISMOS

Para os experimentos foram utilizados os microrganismos *S. aureus* (ATCC 29213 e isolados clínicos 39 e 92), *E. coli* (ATCC 25922), *E. faecalis* (ATCC 51299) e *S. mutans* (ATCC 25175).

Todos pertencentes à coleção de microrganismos do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Oral (LAPEMICRO) da Universidade Federal de Santa Maria, RS.

4.2 ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *C. martinii* utilizado foi comercialmente adquirido através da FERQUIMA Indústria e Comércio LTDA (CNPJ: 51.699.205/0001-48), lote 114, e validade abril de 2023.

4.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO DE *C. martinii*

A amostra do óleo essencial foi diluída 1:100 em hexano. A análise do perfil dos componentes foi feita usando um cromatógrafo a gás equipado com um detector de ionização de chama (GC-FID; Varian Star 3400) e um amostrador automático (Varian 8100). 1 µL do óleo foi injetado em um modo de divisão 1:20, com a temperatura do injetor à 250 °C. O gás carreador utilizado foi hidrogênio com a pressão de 15 psi. A separação dos analitos foi realizada por uma coluna capilar BPX5 (25 mm x 0.22 mm; 0.25 µm espessura fase estacionária). A temperatura começou em 40 °C por 1 minuto e aumentou 2 °C.min⁻¹ até atingir 120 °C, em seguida chegou a 250 °C aumentando 10 °C.min⁻¹, onde se manteve por 2 minutos. A temperatura do detector FID operou a 250 °C. Os resultados foram expressos em porcentagem a partir da normalização das áreas dos picos cromatográficos em relação à área total.

A análise qualitativa dos compostos foi feita por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa (Shimadzu GCMS QP-2010 Ultra) usando as mesmas condições cromatográficas descritas acima para GC-FID. O detector do espectrofotômetro de massa foi operado no modo ionização eletrônica em um único analisador de massa quadrupolo em modo de varredura completa com uma faixa de

35 a 400 m/z. A interface GC-MS e fonte de ionização foram mantidas em 250 e 200 °C, respectivamente. A identificação dos analitos foi realizada comparando os espectros de massa experimentais com os encontrados na biblioteca do NIST. Além disso, a taxa de retenção linear dos compostos foi calculada usando uma série de alcanos homólogos e comparados àqueles descritos na literatura (ADAMS, 1995).

4.4 DISCO-DIFUSÃO

O teste de suscetibilidade foi realizado inicialmente pela técnica de disco-difusão, previamente descrita por Bauer e colaboradores (1966) em ágar Mueller Hinton (MH), para todas as bactérias, exceto para *Streptococcus mutans*, que foi realizado em ágar Brain Heart Infusion - BHI. A suspensão (0,5 na escala McFarland) contendo o microrganismo foi semeada em placa e 10 µL do óleo de *C. martinii* foi adicionado ao disco estéril que por sua vez foi depositado na placa. Após a adição dos discos, a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C e as zonas de inibição foram mensuradas em milímetros. O teste foi realizado em duplicata.

4.5 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM)

A CIM foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços (CLSI, 2012) com modificações. Diferentes concentrações (20 – 0,06 mg/mL) do óleo de *C. martinii* foram adicionadas em poços contendo 100 µL de caldo MH, em seguida foram adicionados 15µL de inóculo contendo o microrganismo (*E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* ou *S. mutans*) na escala 0,5 de McFarland. O controle positivo de crescimento foi considerado poço com inóculo em caldo e o controle negativo somente caldo sem inóculo, a placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. O ensaio foi realizado em triplicata. Após a incubação, foi observado o poço com a menor concentração que não houve crescimento microbiano visível. Para determinar a CBM, uma alíquota de 1 µL foi retirada de cada poço, semeada em ágar BHI (*S. aureus*, *E. faecalis* e *S. mutans*) ou ágar MacConkey (*E. coli*) e incubada por 24 horas a 37 °C. Após as colônias foram identificadas e a menor concentração que não demonstrou crescimento microbiano foi considerada a CBM.

4.6 FORMAÇÃO E TRATAMENTO DO BIOFILME

O biofilme foi formado de acordo com condições previamente descritas por Sandberg et al. (2008, 2009) com algumas modificações. Inóculos dos microrganismos foram preparados na escala 0,5 de McFarland em salina estéril. Após, 15 µL dessa suspensão foi adicionada em placa de 96 poços, contendo 100 µL de caldo *Trypticase Soy Broth* (TSB) suplementado com 2% de glicose por poço (*S. aureus* e *E. faecalis*), caldo BHI suplementado com 2% de sacarose (*S. mutans*) ou caldo MH (*E. coli*). A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C. Após a formação do biofilme, foi adicionado 100 µL do tratamento com as concentrações relativas a CIM, 2x CIM e 4x CIM (MANNER et al., 2013). Para realização do tratamento o óleo foi diluído em caldo (MH, BHI ou TSB) com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) em relação ao volume final. Um controle positivo de crescimento foi realizado contendo caldo e inóculo do microrganismo, enquanto o controle negativo de crescimento foi realizado contendo somente o caldo. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.7 INIBIÇÃO DA FORMAÇÃO DO BIOFILME

Para esse ensaio, realizado de acordo com Flores et al. (2016) com adaptações, em triplicata, foram adicionados 100 µL de caldo TSB + 2% glicose (*E. faecalis* e *S. aureus*), BHI + 2% sacarose (*S. mutans*) ou MH (*E. coli*) em uma placa de 96 poços. Em seguida, adicionados 100 µL do tratamento em concentrações subinibitórias (1/2 CIM, 1/4 CIM e 1/8 CIM) e 15 µL dos inóculos na escala 0,5 de McFarland. A placa foi incubada por 24 horas a 37 °C.

4.8 DOSAGEM DA BIOMASSA DO BIOFILME

Após o tratamento, o sobrenadante foi removido e os poços foram lavados com água destilada 3 vezes para realização da quantificação. O resultado do biofilme tratado foi medido fixando em estufa a 60 °C por 1 hora e corado com 200 µL de cristal violeta a 1% por 10 minutos em temperatura ambiente. Após a incubação as placas foram novamente lavadas com água destilada, e 200 µL de etanol a 95% foram adicionados para dissolver a coloração, e, após 15 minutos, foram transferidos 150 µL

em uma nova placa para medir a densidade ótica (D.O) (570 nm) em leitor de microplacas (TP-Reader; ThermoPlate, Goiás, Brazil). A formação do biofilme foi determinada pela diferença entre a média da DO obtida do controle positivo (caldo + inóculo) e o tratamento com óleo essencial (STEPANOVIĆ et al., 2007).

4.9 QUANTIFICAÇÃO DE CÉLULAS VIÁVEIS NO BIOFILME

Após a formação e o tratamento do biofilme, o número de células viáveis do biofilme foi determinado pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFCs) após suspender as células do biofilme (LOPES et al., 2019), com adaptações. Os biofilmes de *S. aureus* foram lavados com salina estéril para remover células que não estavam aderidas e então o biofilme foi ressuspenso com repetidas pipetagens para romper o biofilme e liberar as células. Em seguida, foi feita uma diluição 1:100 no controle positivo. E, após isso, uma alíquota foi semeada em ágar Nutriente e incubada por 24 horas a 37 °C. Após o período de incubação, as colônias do biofilme tratado foram contadas e comparadas as do biofilme não tratado. Este ensaio foi realizado em triplicata.

4.10 CINÉTICA DE ATIVIDADE EM BIOFILME FORMADO

A cinética da eficácia do óleo essencial de *C. martinii* foi avaliada contra biofilme pela curva de combate dependente do tempo (LOPES et al., 2019). Para a formação do biofilme de *S. aureus*, foram adicionados 200 µL de caldo TSB suplementado com 2% de glicose e em microtubos e 30 µL de inóculo em microtubos, após incubação por 24 horas a 37 °C, o meio foi retirado e substituído por 200 µl do tratamento nas concentrações 1× CBM, 2× CBM e 4× CBM do óleo de *C. martinii*. Nos intervalos de 0, 3, 6, 12 e 24 horas, a atividade antibiofilme foi avaliada pela dosagem da biomassa do biofilme (item 4.8) O ensaio foi realizado em triplicata e a absorbância foi lida em leitor de microplacas (570 nm).

4.11 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITO-GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MONONUCLEARES DO SANGUE PERIFÉRICO (PBMCs)

4.11.1 Cultura de células e tratamentos

Células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) derivadas do sangue total de amostras descartadas de adultos saudáveis foram obtidas do Laboratório de Análises Clínicas Laboratório da Universidade Franciscana (LEAC-UFN) (protocolo experimental aprovado pelo Comitê de Ética em Seres Humanos da UFN) (CAAE número: 31211214.4.0000.5306) com ausência de dados de identificação.

As amostras de sangue foram processadas para separação de PBMC usando o procedimento com base na diferença no gradiente de densidade usando o Ficoll Histopaque-1077VR reagente (Sigma-Aldrich). Após o sangue ter sido descartado no reagente (1:1 v/v), as amostras foram centrifugadas por 30 minutos, 1500RPM. PBMCs foram distribuídos em placas de 96 poços contendo meio celular RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) contendo 10% de soro fetal bovino e suplementado com 1% de antibióticos. As células foram cultivadas em 2×10^5 células mL^{-1} por poço (BOTTON et al. 2015). Em seguida, as células foram expostas a cada composto testado para o protocolo de eficácia descrito nesta pesquisa, em diferentes concentrações por 24 h (2,5; 5 e 10 mg/mL), para avaliar seu efeito na modulação celular por meio de diferentes ensaios colorimétricos e fluorométricos. Todos os tratamentos e os ensaios foram realizados em triplicata para garantir análise estatísticas coerentes. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 200 μM foi usado como controle positivo para todos os testes.

4.11.2 Ensaio de MTT

No ensaio de redução de MTT, o sal de tetrazolium, hidrossolúvel e de coloração amarelada, é facilmente incorporado por células viáveis, que reduzem este composto pela atividade da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase. Ao ser reduzido, o MTT é convertido em um composto de formazan, insolúvel em água e de coloração roxo-azulado, o qual armazena-se no citoplasma celular (FUKUI; YAMABE; ZHU, 2010). Assim, é possível estabelecer parâmetros de citotoxicidade e taxas de proliferação celular.

O ensaio foi realizado conforme o método de Mosmann (1983) e para este fim, ao completar os tempos de incubação das células, adicionou-se 20 µL da solução de MTT (0,01 M e pH 7,4), na concentração de 5 mg/mL, diluída em PBS (tampão fosfato 1X). As placas que receberem a solução de MTT foram homogeneizadas e incubadas durante 2 horas a 37 °C, protegidas da luz, em estufa com 5% de CO₂. Posteriormente, as placas foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min. Então, retirou-se o sobrenadante dos poços e as células foram ressuspensas em 150 µL de DMSO. A absorbância é proporcional ao número de células viáveis e foi determinada por leitora Elisa Anthos 2010 (Labtec, Áustria) em comprimento de onda de 570 nm. Além disso, a determinação do potencial citotóxico foi apresentada como porcentagem em relação ao controle negativo (células em meio de cultura).

4.12.3 Ensaio de óxido nítrico

O teste de óxido nítrico (ON) detecta a presença de nitrito orgânico na amostra. Este é detectado e analisado quando se adiciona o reagente de Griess na amostra contendo NO²⁻ e a coloração rosa aparece na solução (CHOI et al., 2012; NOH et al., 2015). Para este ensaio, a amostra utilizada foi o sobrenadante da cultura celular, onde adicionou-se 50 µL deste em uma nova placa de 96 poços. A seguir, foi adicionado 50 µL da solução de Griess, composta por uma solução I (Sulfanilamida 1%) + a solução II (N-1-naftiletilenodiamino-biclorado 0,1%), na proporção 1:1. A amostra foi mantida no escuro, em temperatura ambiente, durante 15 minutos. Por último, a absorbância foi determinada por leitora de ELISA, em comprimento de onda de 570 nm.

4.11.4 Ensaio de DCFH-DA

O ensaio fluorimétrico de 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) é baseado na desacetilação desta substância por esterases citosólicas em diclorofluorescina (DCFH). A DCFH é um produto não fluorescente que quando em contato com espécies reativas é convertido em diclorofluoresceína (DCF). A DCF, por sua vez, possui característica fluorescente e é facilmente visualizada, pois quando excitada a 488 nm emite luz de 525 nm. Este ensaio é comumente utilizado para medir o nível de espécies reativas no sobrenadante celular, principalmente o peróxido de

hidrogênio, sendo diretamente proporcional à intensidade da fluorescência (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004). Para esta técnica, foi utilizado placa preta de 96 poços, onde adicionou-se 50 µL do sobrenadante da cultura celular, 65 µL de Tris-HCl (10 mM, pH =7,4) e 10 µL do reagente DCFH-DA. Posteriormente, a placa foi incubada por 1 h, no escuro. A leitura de fluorescência foi determinada por Fluorímetro, em 525 nm de emissão e 488 nm de excitação.

4.11.5 Ensaio de Picogreen

A avaliação de genotoxicidade dos compostos, foi analisada por um ensaio fluorométrico de quantificação de DNA de fita dupla extracelular livre (dsDNA) no meio devido a apoptose celular. Para isso, utilizou-se o reagente PicoGreen®, corante fluorescente capaz de se ligar ao dsDNA (COSSETIN et al., 2019). Para a realização do ensaio, foi utilizado uma placa preta de 96 poços, onde adicionou-se 10 µL do sobrenadante da cultura celular, 80 µL de TE 1X (Tris HCl 10mM e EDTA 1 mM pH=7,5) e 10 µL do reagente DNA PicoGreen®. Posteriormente, a placa foi incubada por 1 h, no escuro. A leitura de fluorescência foi determinada por Fluorímetro em 520 nm de emissão e 480 nm de excitação.

4.12 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA CITOTOXICIDADE EM FIBROBLASTOS E QUERATINÓCITOS

4.12.1 Linhagens celulares

Fibroblastos murinos L929 e queratinócitos humanos HACAT foram adquiridos do Banco de Células do Rio Janeiro (BCRJ). As células foram cultivadas em Meio Eagle modificado por Dulbecco com baixo teor de glicose (DMEM) (Sigma-Aldrich®), suplementado com soro fetal bovino (FBS) 10% (v/v), penicilina/streptomina (100 U/l) (Sigma®), em uma incubadora umidificada com atmosfera de 5% CO₂ (Laboven).

4.12.2 Ensaio de citotoxicidade

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de 3(4,5-dimethyl)-2,5diphenyltetrazolium bromide (MTT) (Sigma-Aldrich®) em células L929 3×10^4

células/poço e para HCAT 4×10^4 células/poço semeadas em placas de 96 poços. O ensaio foi realizado como descrito por Mosmann (1983). Após 24 horas, o meio de cultura foi removido e substituído por meio fresco, e cada linhagem celular foi exposta ao tratamento com óleo essencial de *C. martinii* nas concentrações de 2,5; 5 e 10 mg/mL.

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados dos estudos microbiológicos foram submetidos a análise de variância ANOVA de uma via seguido do teste de Dunnett com intervalo de confiança de 95%. Os ensaios estatísticos foram realizados no programa *GraphPad Prism 8* (GraphPad Software, INC). Os experimentos foram realizados em triplicata.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise do óleo (tabela 1), foram encontrados 10 compostos, sendo o geraniol (83,8%) e o acetato de geranila (8,7%) os compostos predominantes. De acordo com a literatura, a porcentagem de geraniol varia entre 65 e 84,1%, sendo, em média, 77,7%, enquanto a de acetato de geranila é cerca de 12% (DUBEY; MALLAVARAPU; LUTHRA, 2000; RAO, 2001; PRASHAR et al., 2003; RAO et al., 2005; MARINKOVIĆ et al., 2020). Os resultados obtidos corroboram com os dados fornecidos pelo fabricante, onde a porcentagem de geraniol é de 82% e a de acetato de geranila é de 9%.

Tabela 1 – Resultados da análise qualitativa dos compostos por cromatografia gasosa acoplado a espectrômetro de massa e da análise do perfil dos componentes do óleo essencial de *C. martinii*

Composto	TR	IRE	IRL	%
ni	9,54	1034	-	0,32
cis-beta-ocimeno	9,76	1044	1040	0,12
trans-beta-ocimeno	9,96	1053	1050	1,17
Linalol	13,23	1103	1098	1,94
Geraniol	23,37	1258	1255	83,81
Geranial	24,60	1267	1270	0,57
Acetato de geranila	30,96	1383	1383	8,70
beta-cariofileno	32,02	1400	1418	2,31
Óxido de cariofileno	42,01	1578	1581	0,19
Caproato de geranila	46,50	1781	1756	0,86

Análise qualitativa e quantitativa dos compostos por GC-MS. TR: tempo de retenção em minutos. IRE: índice de retenção experimental. IRL: índice de retenção literatura.

As propriedades antimicrobianas do *C. martinii* se devem, principalmente ao geraniol. A atividade desse composto causa um extravasamento de íons K^+ e Mg^{2+} , devido a sua característica apolar, rompendo a membrana celular do microrganismo, tornando-o, inclusive, mais permeável a outros compostos, como antibióticos. Além disso, este composto induz ao estresse osmótico e danos ao DNA (PRASHAR et al., 2003; GAONKAR; AVTI; HEGDE, 2018; MAÇZKA; WIŃSKA; GRABARCZYK, 2020).

No teste de disco difusão (tabela 2), o microrganismo mais sensível ao óleo essencial foi a *E. coli*. Em geral, os halos de inibição na literatura para *S. aureus* são similares aos encontrados no presente estudo (MILLEZI et al., 2016, 2020).

Em um estudo de Pontes et al. (2018), foi demonstrado que o óleo de *Cymbopogon nardus*, que também é rico em geraniol (cerca de 33% de sua composição), tem halos de inibição similares para *E. faecalis* (13 mm). Neste mesmo estudo, o halo de inibição do geraniol foi de 19 mm para *S. aureus*, 11 mm para *E. faecalis* e 15 mm para *E. coli*, sendo medições mais próximas ao *C. martinii*.

Tabela 2 – Resultados do ensaio de disco-difusão

Microrganismo	Cepa/Isolado	Tamanho do Halo (média) + DP
<i>E. coli</i>	25922	22 mm ± 1
<i>E. faecalis</i>	51299	9,5 mm ± 0,5
<i>S. aureus</i>	29213	12,5 mm ± 0,5
<i>S. aureus</i>	IC 39	10,5 mm ± 0,5
<i>S. aureus</i>	IC 92	11 mm ± 1
<i>S. mutans</i>	25175	13,5 mm ± 0,5

Para todos os microrganismos, os valores de CIM e CBM foram iguais, como demonstrado na tabela 3, ocorrendo a menor concentração inibitória em *E. coli* e *S. aureus* (29213 e IC 92), ambas 5 mg/mL.

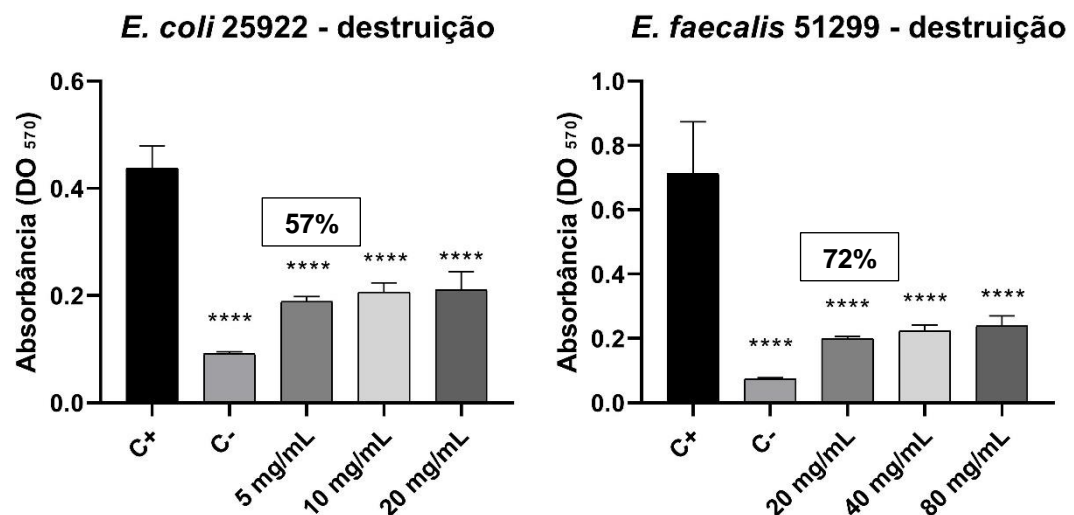
Há diversas variações de CIM e CBM na literatura, isso provavelmente se deve às diferentes concentrações de geraniol encontradas nos óleos essenciais. Foram encontrados valores de 0,25 mg/mL a 2 mg/mL de CIM e valores de CBM que variam de 1 a 2 mg/mL para *S. aureus* (SCHERER et al. 2009; MARINKOVIĆ et al., 2020; PIASECKI et al., 2021).

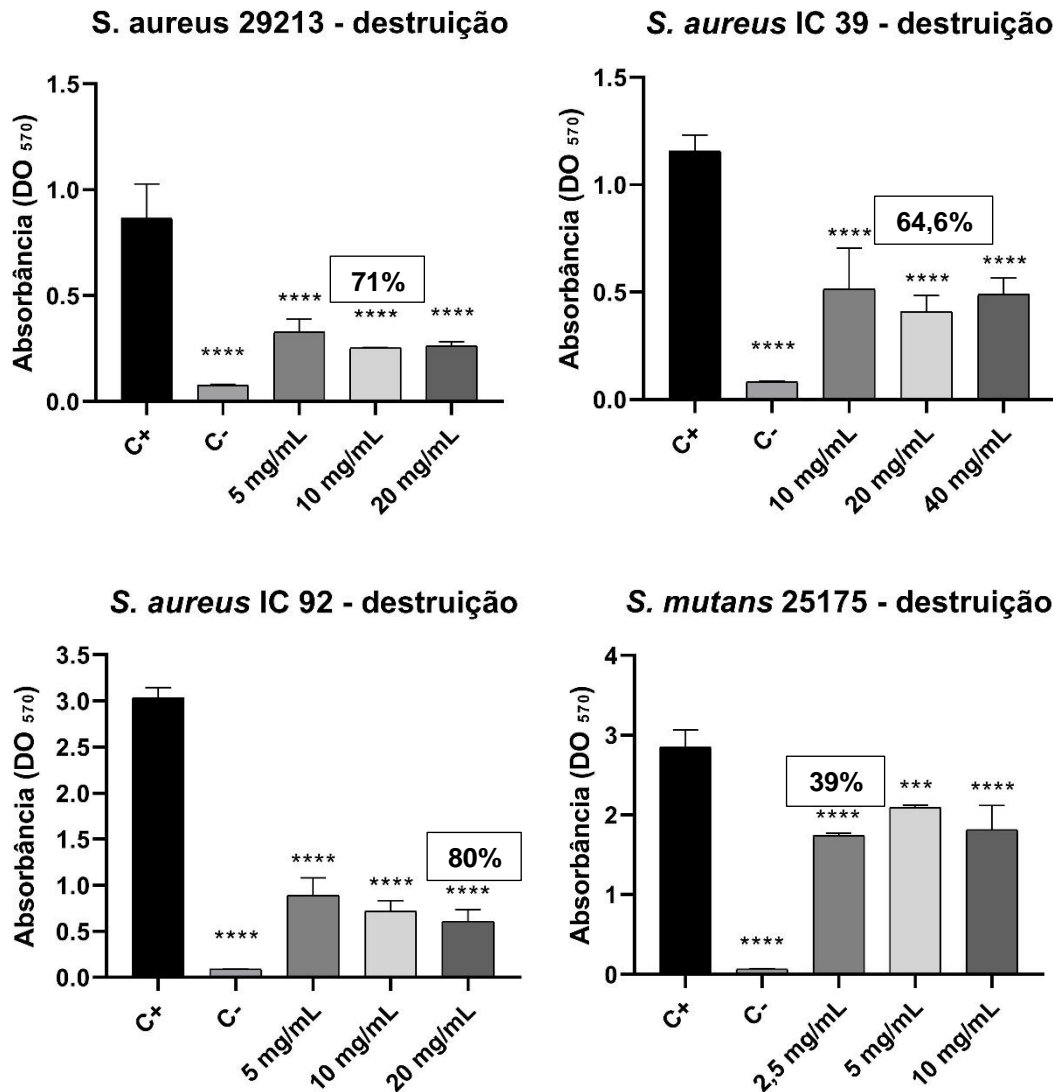
Tabela 3 – Resultados de CIM e CBM

Microrganismo	Cepa/Isolado	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
<i>E. coli</i>	25922	5	5
<i>E. faecalis</i>	51299	20	20
<i>S. aureus</i>	29213	5	5
<i>S. aureus</i>	IC 39	10	10
<i>S. aureus</i>	IC 92	5	5
<i>S. mutans</i>	25175	2,5	2,5

A partir do teste de destruição do biofilme (figura 3), foi observado que o óleo de Palmarosa, em sua menor concentração reduz em 62,1 % o biofilme de *S. aureus* (29213), e sua maior redução ocorre na concentração de 10 mg/mL (71%). Em *E. coli* a destruição é de cerca de 54% para todas as concentrações do óleo. A maior redução ocorreu em *S. aureus* IC 92, onde houve uma diminuição de 80% do biofilme em sua maior concentração e 70,6% em sua menor concentração. Enquanto a menor redução ocorreu em *S. mutans*, havendo uma destruição de apenas 39% do biofilme em sua menor concentração. Para *E. faecalis*, na menor concentração testada, a redução foi de 72%, e, para o IC 39 de *S. aureus*, a maior redução foi de 64,6% na concentração de 20mg/mL.

Figura 3 – Destruição do biofilme formado de *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* (29213, IC 39 e IC 92) e *S. mutans*.

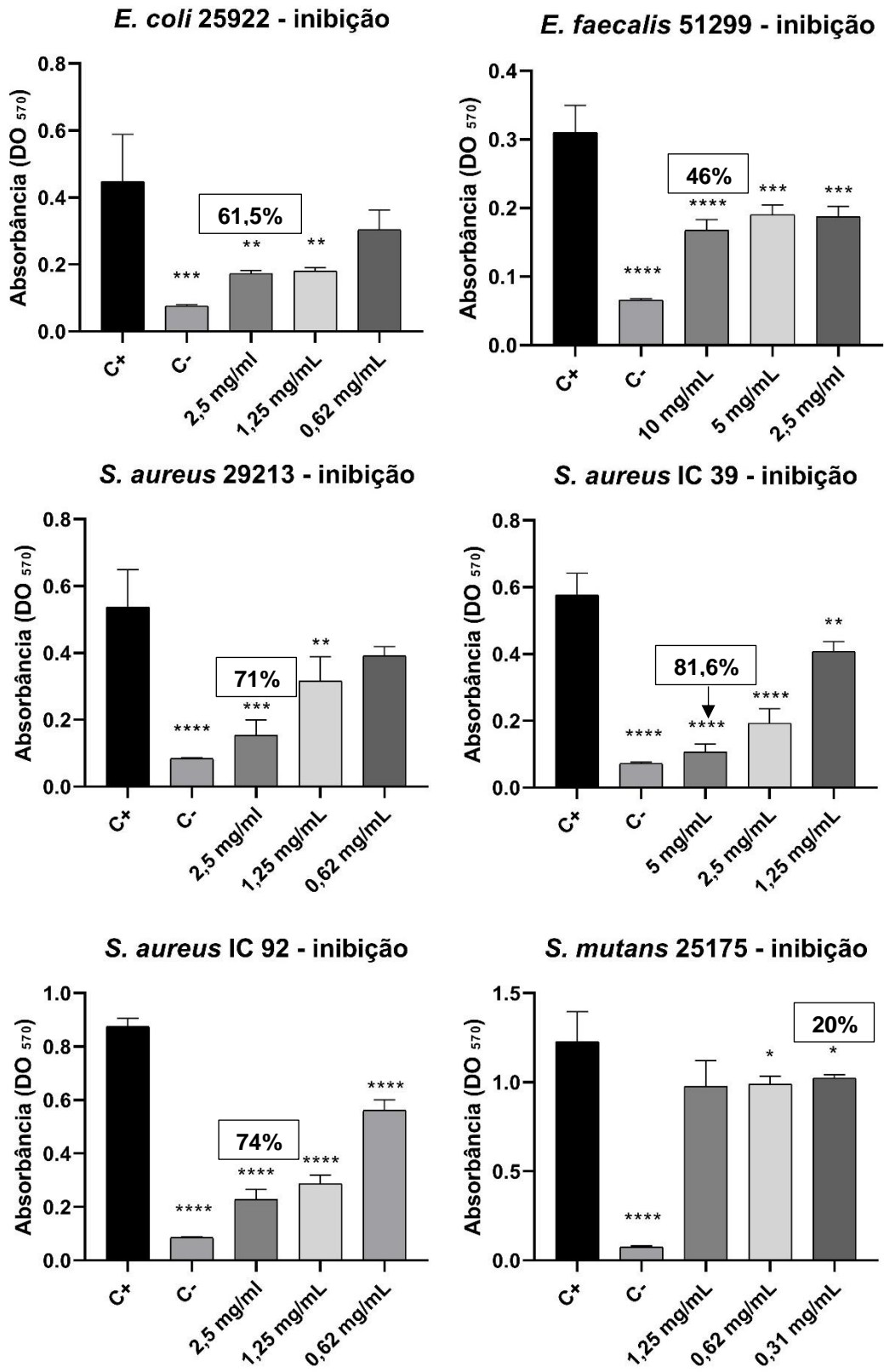




Quantificação da biomassa do biofilme após destruição com *Cymbopogon martinii*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido pelo teste Tukey considerando estatisticamente significantes quando $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) comparando ao controle positivo (C+). C-: controle negativo.

Na inibição da formação do biofilme (figura 4), a *E. coli* demonstrou redução de 61,5% em sua menor concentração. A maior redução ocorreu no IC 39 de *S. aureus*, onde, na concentração de 5 mg/mL, foi de 81,6%, para a cepa ATCC a redução foi de 71% em 2,5mg/mL, nesta mesma concentração, a redução do IC 92 foi de 74%. *E. faecalis* e *S. mutans* foram os microrganismos que apresentaram as menores reduções, sendo de 46% e 20%, respectivamente.

Figura 4 – Resultados da inibição da formação do biofilme de *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus* (29213, IC 39 e IC 92) e *S. mutans*.



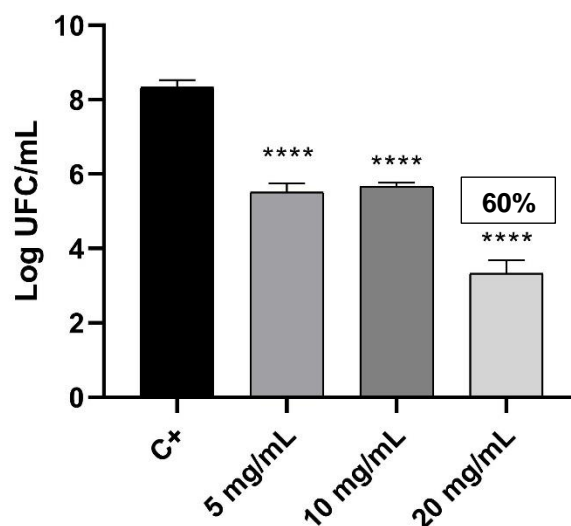
Quantificação da biomassa do biofilme após inibição com *Cymbopogon martinii*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido pelo teste Tukey considerando estatisticamente significantes quando $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) comparando com o controle positivo (C+). C-: controle negativo.

A partir dos testes acima, foi observada uma ação mais significativa do óleo essencial de *C. martinii* em *S. aureus* (ATCC 29213), portanto, os demais testes foram realizados apenas com este microrganismo. Isto provavelmente se deve a potencial atividade do geraniol em bactérias Gram positivas (GALLUCCI et al., 2009).

Após a realização da quantificação de células viáveis no biofilme (figura 5), foi observado que em todas as concentrações houve redução significativa no número de unidades formadoras de colônias, sendo maior na concentração de 20mg/mL, que foi de 60%.

Em um estudo utilizando outra espécie do gênero *Cymbopogon* (*C. flexuosus*), cujos principais componentes são geraniol (41%) e nerol (33%), houve redução significativa em *S. aureus* na concentração de 0,78% (COSTA; MOURA; MILLEZI, 2019).

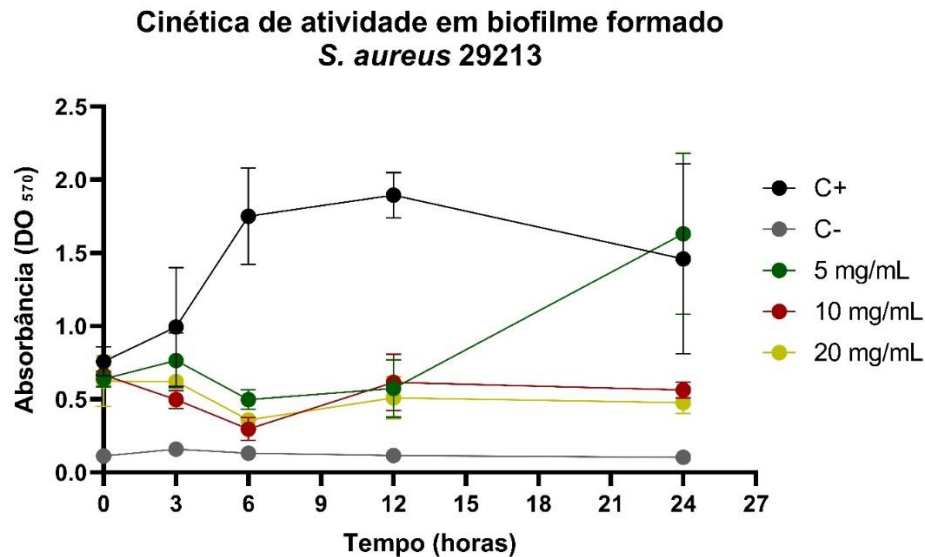
Figura 5 – Resultado da quantificação de células viáveis no biofilme de *S. aureus* após tratamento



Quantificação de células viáveis no biofilme de *S. aureus* após tratamento com *Cymbopogon martinii*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido pelo teste Tukey considerando estatisticamente significantes quando $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****). C+: controle positivo.

Na cinética de atividade em biofilme formado (figura 6), houve uma diminuição significativa do biofilme em 6 horas em todas as concentrações, se tornando estável após 12 horas nas maiores concentrações.

Figura 6 – Resultado da cinética de atividade em biofilme formado de *S. aureus*



Cinética de atividade em biofilme formado. Dados expressos em média \pm desvio padrão. C-: controle negativo. C+: controle positivo.

Para avaliação do perfil de segurança do óleo essencial foram utilizadas diferentes linhagens celulares, de modo que foi possível verificar o efeito do óleo para diferentes aplicações.

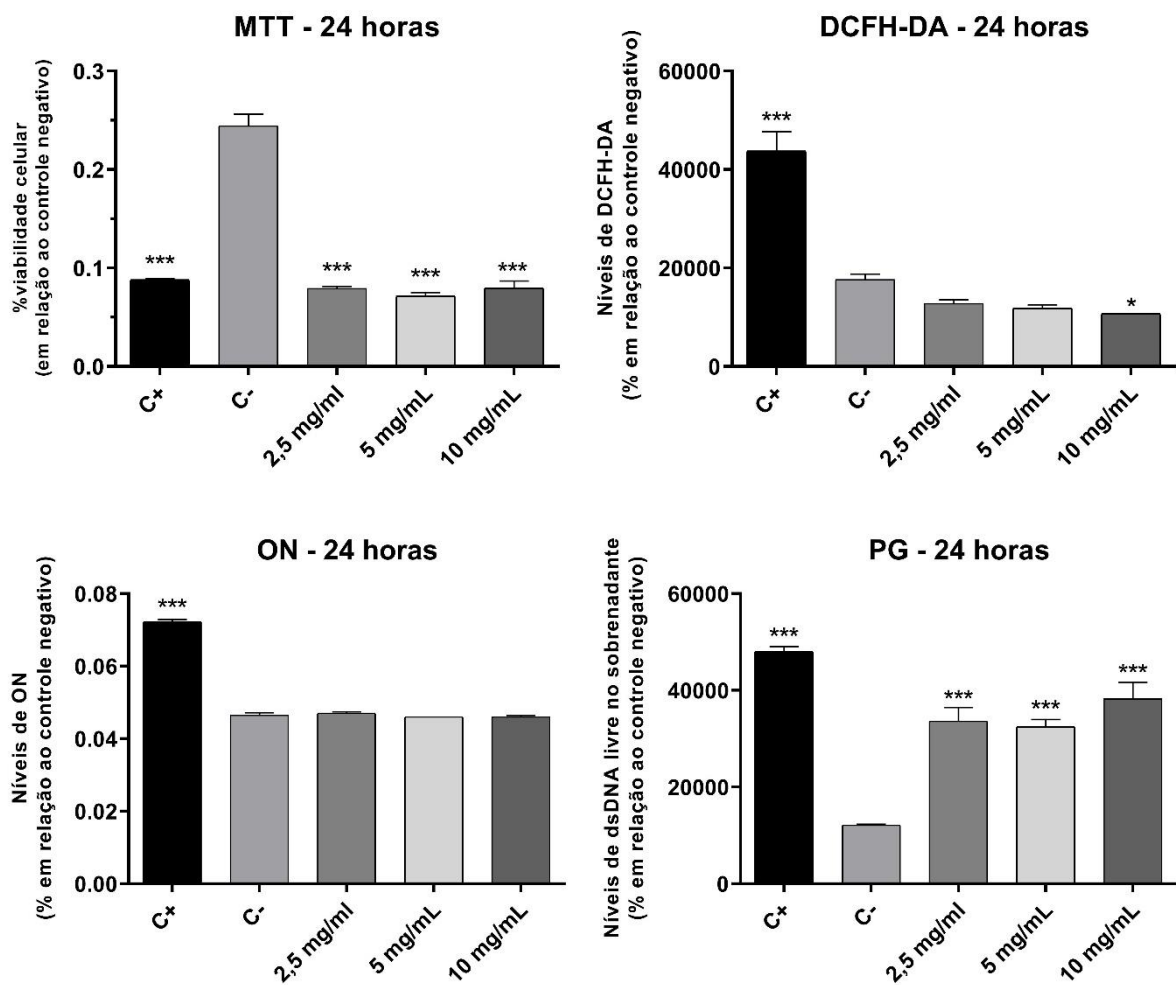
A partir dos resultados de cito-genotoxicidade (figuras 7 e 8), pode ser observada uma atividade citotóxica do óleo de *C. martini* tanto para PBMCs quanto para fibroblastos e queratinócitos. Exceto no ensaio de óxido nítrico, onde não houve alteração significativa.

O efeito cito e genotóxico do geraniol foi testado individualmente por Queiroz et al. (2017). O ensaio de MTT foi realizado utilizando PMCs e células de hepatoma humano (HepG2), e apontou que não houve toxicidade, porém, ressalta que em concentrações acima de 100 $\mu\text{g/mL}$ foram observados efeitos citotóxicos.

No estudo de Sinha et al. (2014), foram utilizados linfócitos humanos para avaliação de cito e genotoxicidade do óleo de Palmarosa. Após o ensaio de MTT, foi visto que na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ não houve redução significativa na

viabilidade celular, corroborando com o estudo de Marinković et al. (2020), que demonstrou que em baixas concentrações, o óleo essencial não diminui de forma significativa a viabilidade celular. Neste estudo, onde também foi realizado o ensaio de MTT, mas em fibroblastos fetais humanos (MRC-5), e houve redução de 40% na viabilidade celular na concentração de 0,12 mg/mL. Neste mesmo estudo, apesar das demais concentrações apresentarem uma maior toxicidade, foram próximas ao controle (TAP – metronidazol, ciprofloxacina e minociclina). Em outro estudo, foi demonstrado que *C. martinii* em baixas concentrações (0,1 – 10 µg/mL) não reduz a viabilidade de monócitos (ANDRADE et al., 2014).

Figura 7 – Resultados dos ensaios de MTT, óxido nítrico (ON), 2,7-diacetato de diclorofluoresceína (DCFH-DA) e picogreen (PG).



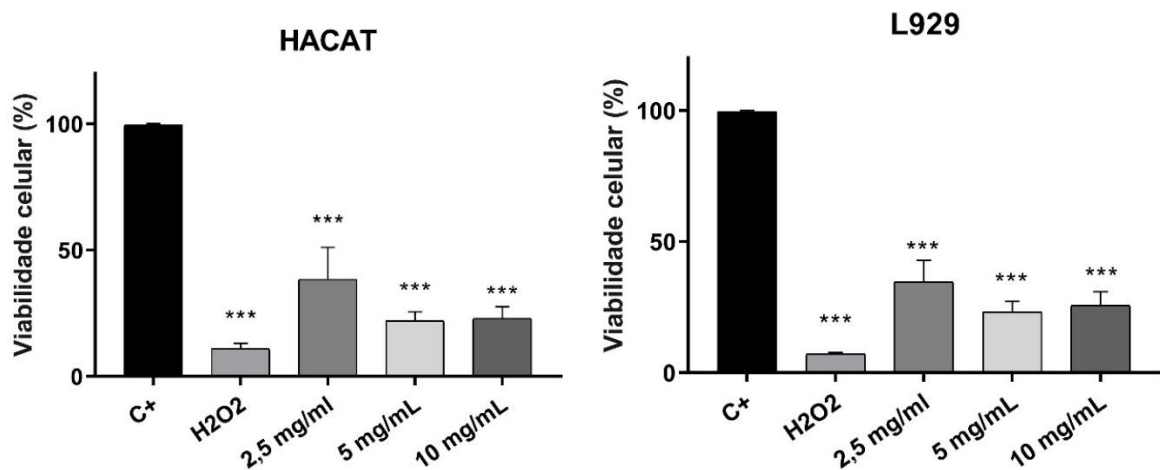
Ensaios de cito-genotoxicidade com diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon martinii*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido

pelo teste Tukey considerando estatisticamente significantes quando $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) comparando com o controle negativo (C-). C+: controle positivo.

Apesar da grande diminuição na viabilidade celular em queratinócitos e fibroblastos, ainda foi menor que a redução com H_2O_2 (Figura 8).

No estudo de Singulani et al. (2018), onde foi realizada a avaliação da genotoxicidade do geraniol em embriões de peixe-zebra, foi relatado um efeito tóxico e em altas concentrações houve indução a deformidade e morte dos embriões.

Figura 8 – Resultados do ensaio de MTT com as linhagens L929 e HCAT.



Ensaio de MTT com diferentes concentrações do óleo essencial de *Cymbopogon martinii*. Dados expressos em média \pm desvio padrão. Análise de variância ANOVA one-way seguido pelo teste Tukey considerando estatisticamente significantes quando $p < 0,5$ (*), $p < 0,01$ (**), $p < 0,001$ (***) e $p < 0,0001$ (****) comparando com o controle positivo (C+).

Vários estudos sugerem o uso de nanopartículas para contornar algumas características do geraniol, como volatilidade e sua natureza hidrofóbica, principalmente no seu uso na indústria cosmética e alimentícia, portanto pode, também, ser uma alternativa para diminuir a sua toxicidade no seu uso como antimicrobiano (BALTA et al., 2017; MAÇZKA; WIŃSKA; GRABARCZYK, 2020; NEE et al., 2018). O uso de nanopartículas pode ser uma alternativa para diminuir a concentração do óleo essencial diminuindo, assim, a sua toxicidade (KAMOU et al., 2022).

6 CONCLUSÃO

- Após a caracterização do óleo essencial do óleo de *C. martinii*, foi observada uma alta concentração de geraniol, 83,8%, que apresenta efeito antimicrobiano;
- De acordo com os resultados de disco-difusão, CIM e CBM pode-se concluir que o óleo de Palmarosa possui efeito antimicrobiano, principalmente em bactérias Gram positivas (*E. faecalis*, *S. aureus* e *S. mutans*);
- A partir da análise dos resultados de destruição e inibição do biofilme, cinética de atividade e quantificação de células viáveis, é possível verificar que há capacidade de destruição de biofilme nas bactérias testadas, principalmente *S. aureus*;
- A avaliação da segurança de uso demonstrou toxicidade nas concentrações testadas;
- Mais estudos devem ser realizados para avaliar se o uso de nanopartículas reduz a concentração de óleo utilizada, levando a diminuição da citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P.. **Identification of Essential Oil Components By Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 2. ed. Allured Pub. Corp., 1995. 804 p.
- ALMEIDA, E.R.. *Plantas Medicinais Brasileiras: conhecimentos populares e científicos*. São Paulo: **Hemus**, 1993.
- ANDRADE, B. F. M. T. et al. Cymbopogon martinii essential oil and geraniol at noncytotoxic concentrations exerted immunomodulatory/anti inflammatory effects in human monocytes. **Journal Of Pharmacy And Pharmacology**, v. 66, n. 10, p. 1491-1496, 16 jun. 2014.
- ANVISA. *Infecções Relacionadas à Assistência à Saúde (IRAS) e resistência microbiana (RM) em serviços de saúde*. Rio Grande do Sul, 2022. 33 p.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food And Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, fev. 2008.
- BALTA, I. et al. Geraniol and Linalool Loaded Nanoemulsions and Their Antimicrobial Activity. **Animal Science And Biotechnologies**, v. 74, n. 2, p. 157, 26 nov. 2017.
- BAUER, A.W. et al. Antibiotics susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**. v.45 p.493- 496, 1966.
- BEHLAU, I.; GILMORE, M. S. Microbial biofilms in ophthalmology and infectious disease. **Archives of ophthalmology**, v. 126, n. 11, p. 1572–1581, 2008.
- BOTTON, G. et al. Induction of cytotoxicity, oxidative stress, and genotoxicity by root filling pastes used in primary teeth. **International Endodontic Journal**. v.49, n.8, p. 737–745, 2015.
- CHEN, W.; VILJOEN, A.M.. Geraniol — A review of a commercially important fragrance material. **South African Journal Of Botany**, v. 76, n. 4, p. 643-651, out. 2010.
- CHOI, W. S. et al. The regulatory effect of veratric acid on NO production in LPS-stimulated RAW264.7 macrophage cells. **Cellular Immunology**, v. 280, n. 2, p. 164–170, 2012.
- COSSETIN, J. F. *et al.* Peanut leaf extract has antioxidant and anti-inflammatory activity but no acute toxic effects. **Regulatory Toxicology And Pharmacology**, v. 107, out. 2019.
- COSTA, K. A. d.; MOURA, R.; MILLEZI, A. F.. Antimicrobial and antibiofilm activity of Cymbopogon flexuosus essential oil microemulsions. **Revista Ceres**, v. 66, n. 5, p. 372-379, out. 2019.

COSTERTON, J. W.; MONTANARO, L.; ARCIOLA, C. R. Biofilm in implant infections: Its production and regulation. **International Journal of Artificial Organs**, v. 28, n. 11, p. 1062–1068, 2005.

COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S.; GREENBERG, E. P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Science**, v. 284, n. 5418, p. 1318–1322, 1999.

DORTA, E.J.; Introdução. In: Escala Rural: especial de plantas medicinais. São Paulo: **Escala Ltda.** v. 1, n.4, p.1-62; 1998.

DUBEY, V. s; MALLAVARAPU, G. R; LUTHRA, R. Changes in the essential oil content and its composition during palmarosa (*Cymbopogon martinii* (Roxb.) Wats. var. motia) inflorescence development. **Flavour And Fragrance Journal**, v. 15, n. 5, p. 309-314, 2000.

DUNNE, W. M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clinical microbiology reviews**, v. 15, n. 2, p. 155–66, 2002.

ELDIN, S.; DUNFORD, A.; Fitoterapia na atenção primária a saúde. São Paulo: **Manole**; 2001.

FITZGERALD, J. R. Evolution of *Staphylococcus aureus* during human colonization and infection. **Infection, Genetics And Evolution**, v. 21, p. 542-547, jan. 2014.

FLEMMING, H.-C. et al. Physico-chemical properties of biofilms. **Biofilms: Recent Advances in Their Study and Control**, p. 19–34, 2000.

FLORES, V. C. et al. Antibiofilm effect of antimicrobials used in the therapy of mycobacteriosis. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 229-235, out. 2016.

FUCHS, B. B. et al. Role of filamentation in *Galleria mellonella* killing by *Candida albicans*. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 6, p. 488–496, 2010.

FUKUI, M.; YAMABE, N.; ZHU, B. T.. Resveratrol attenuates the anticancer efficacy of paclitaxel in human breast cancer cells in vitro and in vivo. **European Journal Of Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1882-1891, jul. 2010.

FUX, C. A. et al. Survival strategies of infectious biofilms. **Trends in Microbiology**, v. 13, n. 1, p. 34–40, 2005.

GALLUCCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour And Fragrance Journal**, v. 24, n. 6, p. 348-354, nov. 2009.

GAONKAR, R.; AVTI, P. K.; HEGDE, G.. Differential Antifungal Efficiency of Geraniol and Citral. **Natural Product Communications**, v. 13, n. 12, p. 1609-1614, dez. 2018.

GUENTHER, E. The Essential Oils. 2. ed. New York: **D. van Nostrade Company, Inc**, 1950. 772 p.

GULATI, M.; NOBILE, C. J.. Candida albicans biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes And Infection**, v. 18, n. 5, p. 310-321, maio 2016.

GUO, H. et al. Biofilm and Small Colony Variants—An Update on Staphylococcus aureus Strategies toward Drug Resistance. **International Journal Of Molecular Sciences**, v. 23, n. 3, p. 1241, 22 jan. 2022.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M.. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?. **British Journal Of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 231-255, maio 2004.

HAMILTON, I. R.; BUCKLEY, N. D.. Adaptation by Streptococcus mutans to acid tolerance. **Oral Microbiology And Immunology**, v. 6, n. 2, p. 65-71, abr. 1991.

HARMSSEN, M.; YANG, L.; PAMP, S. J.; TOLKER-NIELSEN, Tim. An update on Pseudomonas aeruginosa biofilm formation, tolerance, and dispersal. **Fems Immunology & Medical Microbiology**, v. 59, n. 3, p. 253- 268, ago. 2010.

HENRIQUES, A.; VASCONCELOS, C.; CERCA, N.. A importância dos biofilmes nas infecções nosocomiais: o estado da arte. **Arquivos de Medicina**, p. 27-36, 2013.

HOFFMANN, K. H.. Essential oils. **Zeitschrift Für Naturforschung C**, v. 75, n. 7-8, p. 177-177, 30 jun. 2020.

HUANG, Zhi-Xing *et al.* Cajaninstilbene acid analogues as novel quorum sensing and biofilm inhibitors of Pseudomonas aeruginosa. **Microbial Pathogenesis**, v. 148, nov. 2020.

HUYCKE, M. M.; SAHM, D. F.; GILMORE, M. S.. Multiple-Drug Resistant Enterococci: the nature of the problem and an agenda for the future. **Emerging Infectious Diseases**, v. 4, n. 2, p. 239-249, jun. 1998.

JANG, J. et al. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. **Journal Of Applied Microbiology**, v. 123, n. 3, p. 570-581, 3 jul. 2017.

KAMOU, N. N. et al. Impact of Geraniol and Geraniol Nanoemulsions on Botrytis cinerea and Effect of Geraniol on Cucumber Plants' Metabolic Profile Analyzed by LC-QTOF-MS. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2513, 26 set. 2022.

KAPER, J. B.; NATARO, James P.; MOBLEY, Harry L. T.. Pathogenic Escherichia coli. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 123-140, fev. 2004.

KEREN, I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 13–18, 2004.

KIM, M.; ROSA, V.; MIN, K.. Characterization of *Enterococcus faecalis* in different culture conditions. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1-8, 14 dez. 2020.

KWIECINSKI, J. M; HORSWILL, A. R. *Staphylococcus aureus* bloodstream infections: pathogenesis and regulatory mechanisms. **Current Opinion In Microbiology**, v. 53, p. 51-60, fev. 2020.

LEE, A. S. et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 4, n. 1, p. 1-23, 31 maio 2018.

LEI, Y. et al. Pharmacological Properties of Geraniol – A Review. **Planta Medica**, v. 85, n. 01, p. 48-55, 11 out. 2018.

LEMONS, J. A. et al. The Biology of *Streptococcus mutans*. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 1, 8 fev. 2019.

LOPES, L. Q. S. et al. Characterisation and Anti-Biofilm Activity of Glycerol Monolaurate Nanocapsules against *Pseudomonas Aeruginosa*. **Microbial Pathogenesis**, 130: 178–85, 2019.

LOWY, F. D.. *Staphylococcus aureus* Infections. **New England Journal Of Medicine**, v. 339, n. 8, p. 520-532, 20 ago. 1998.

MAÇZKA, W.; WIŃSKA, K.; GRABARCZYK, M.. One Hundred Faces of Geraniol. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 3303-3319, 21 jul. 2020.

MARINKOVIĆ, J. et al. Antimicrobial potential of irrigants based on essential oils of *Cymbopogon martinii* and *Thymus zygis* towards in vitro multispecies biofilm cultured in ex vivo root canals. **Archives Of Oral Biology**, v. 117, p. 104842, set. 2020.

MILLEZI, A. F. et al. Anti-biofilm property of essential oils from *Cymbopogon* sp. against pathogenic bacteria in single-culture and co-culture. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 42, n. 1, p. 1-17, 11 maio 2020.

MILLEZI, A. F. et al. Sensibilidade de bactérias patogênicas em alimentos a óleos essenciais de plantas medicinais e condimentares. **Higiene Alimentar**, v. 30, n. 254, p. 117-122, mar. 2016.

Ministério da Saúde (BR). Secretaria de Vigilância em Saúde. Vigilância em saúde no Brasil 2003|2019: da criação da Secretaria de Vigilância em Saúde aos dias atuais. *Bol Epidemiol [Internet]*. 2019 set; 50(n.esp.):1-154. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55 - 63, 1983.

NEE, T. W. et al. Sustained Release Geraniol Nanoparticles Inhibit Human Axillary Odor-Causing Bacteria. **Arabian Journal For Science And Engineering**, v. 44, n. 1, p. 103-109, 6 dez. 2018.

NIKOLAEV, Y. a.; PLAKUNOV, V. K. Biofilm —City of microbes or an analogue of multicellular organisms? **Microbiology**, v. 76, n. 2, p. 125–138, 2007.

NOH, H. J. et al. Anti-inflammatory activity of a new cyclic peptide, citrusin XI, isolated from the fruits of Citrus unshiu. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 163, p. 106–112, 2015.

O’GARA, J. P. Ica and beyond: Biofilm mechanisms and regulation in Staphylococcus epidermidis and Staphylococcus aureus. **FEMS Microbiology Letters**, v. 270, n. 2, p. 179–188, 2007.

PIASECKI, B. et al. Composition, Anti-MRSA Activity and Toxicity of Essential Oils from Cymbopogon Species. **Molecules**, v. 26, n. 24, p. 7542, 13 dez. 2021.

PONTES, E. K. U. et al. Antibiofilm activity of the essential oil of citronella (Cymbopogon nardus) and its major component, geraniol, on the bacterial biofilms of Staphylococcus aureus. **Food Science And Biotechnology**, v. 28, n. 3, p. 633-639, 30 out. 2018.

PRASHAR, A. et al. Antimicrobial action of palmarosa oil (Cymbopogon martinii) on Saccharomyces cerevisiae. **Phytochemistry**, v. 63, n. 5, p. 569-575, jul. 2003.

QUEIROZ T. B. et al. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). **Genetics and Molecular Research**, v. 16, n. 3, p. 1-12, set. 2017.

RABIN, N. et al. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. **Future Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 4, p. 493-512, mar. 2015.

RAO, B. R. R. et al. Chemical profiles of primary and secondary essential oils of palmarosa (Cymbopogon martinii (Roxb.) Wats var. motia Burk.). **Industrial Crops And Products**, v. 21, n. 1, p. 121-127, jan. 2005.

RAO, B. R. R.. Biomass and essential oil yields of rainfed palmarosa (Cymbopogon martinii (Roxb.) Wats. var. motia Burk.) supplied with different levels of organic manure and fertilizer nitrogen in semi-arid tropical climate. **Industrial Crops And Products**, v. 14, n. 3, p. 171-178, nov. 2001.

SABER, S. E. M.; EL-HADY, S. A.. Development of an intracanal mature Enterococcus faecalis biofilm and its susceptibility to some antimicrobial intracanal medication: an in vitro study. **European Journal Of Dentistry**, v. 6, p. 43-50, jan. 2012.

SANDBERG, M. E. et al. Pros and cons of using resazurin staining for quantification of viable Staphylococcus aureus biofilms in a screening assay. **Journal Of Microbiological Methods**, v. 78, n. 1, p. 104-106, jul. 2009.

SANDBERG, M. et al. Automating a 96-well microtitre plate model for Staphylococcus aureus biofilms: an approach to screening of natural antimicrobial

compounds. **International Journal Of Antimicrobial Agents**, v. 32, n. 3, p. 233-240, set. 2008.

SATPATHY, S. et al. Review on bacterial biofilm: An universal cause of contamination. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 56–66, 2016.

SAUER, K.; RICKARD, A. H.; DAVIES, D. G. Biofilms and Biocomplexity. **Microbe**, v. 2, n. 7, p. 347–353, 2007.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SINGULANI, J. L. et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. **Future Microbiology**, v. 13, n. 15, p. 1637-1646, nov. 2018.

SINHA, S. et al. Evaluation of toxicity of essential oils palmarosa, citronella, lemongrass and vetiver in human lymphocytes. **Food And Chemical Toxicology**, v. 68, p. 71-77, jun. 2014.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **Journal of pathology, microbiology and immunology**, v. 115, n. 8, p. 891 – 899, 2007.

STOODLEY, P.; SAUER, K.; DAVIES, D. G.; COSTERTON, J. W. Biofilms as Complex Differentiated Communities. **Annual Review of Microbiology**, v. 56, n. 1, p. 187–209, 2002.

SUTHERLAND, I. Microbial exopolysaccharides-structural subtleties and their consequences. **Pure and applied chemistry**, v. 69, n. 9, p. 1911–1917, 1997.

TONG, Z. et al. In vitro study of the properties of Streptococcus mutans in starvation conditions. **Archives Of Oral Biology**, v. 56, n. 11, p. 1306-1311, nov. 2011.

TONGNUANCHAN, P.; BENJAKUL, S.. Essential Oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal Of Food Science**, v. 79, n. 7, p. 1231-1249, 2 jun. 2014.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L.. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. 967 p.

WATNICK, P.; KOLTER, R. Biofilm, city of microbes. **Journal of Bacteriology**, v. 182, n. 10, p. 2675–2679, 2000.

WERTHEIM, H. F. et al. The role of nasal carriage in Staphylococcus aureus infections. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 5, n. 12, p. 751-762, dez. 2005.

WIŃSKA, K. et al. Essential Oils as Antimicrobial Agents—Myth or Real Alternative?
Molecules, v. 24, n. 11, p. 2130, 5 jun. 2019.