



Universidade Federal do Maranhão

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação e Inovação

Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto

Mestrado Acadêmico



ATIVIDADE DO EXTRATO E ÓLEO DE *Cymbopogon citratus* SOBRE BIOFILMES DE *Candida albicans*

JESSICA MARQUES DA HORA ROCHA

**São Luís
2019**

JESSICA MARQUES DA HORA ROCHA

ATIVIDADE DO EXTRATO E ÓLEO DE *Cymbopogon citratus* SOBRE BIOFILMES DE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de concentração: Ciências aplicadas à Saúde do Adulto

Linha de Pesquisa: Doenças infecciosas e endêmicas no Maranhão

Orientadora: Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra

Co-orientadora: Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

**São Luís
2019**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Rocha, Jessica Marques da Hora.

Atividade do extrato e óleo de *Cymbopogon citratus*
sobre biofilmes de *Candida albicans* / Jessica Marques da
Hora Rocha. - 2019.

49 p.

Coorientador(a): Maria do Desterro Soares Brandão
Nascimento.

Orientador(a): Geusa Felipa de Barros Bezerra.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2019.

1. Biofilme. 2. *Candida albicans*. 3. *Cymbopogon*
citratus. 4. Extract. 5. Oil. I. Bezerra, Geusa Felipa
de Barros. II. Nascimento, Maria do Desterro Soares
Brandão. III. Título.

JESSICA MARQUES DA HORA ROCHA

ATIVIDADE DO EXTRATO E ÓLEO DE *Cymbopogon citratus* SOBRE BIOFILMES DE *Candida albicans*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão, para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado apresentada em sessão pública considerou a candidato aprovada em: **04 / 09 / 2019**.

Prof^a. Dra. Geusa Felipa de Barros Bezerra (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dra. Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento (Co-orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a. Dr^a. Sally Cristina Moutinho Monteiro (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. José Eduardo Batista (Examinador)
Universidade Federal do Maranhão

Dedico a Deus, aos meus pais e esposo, familiares que me apoiaram e aos meus amigos.

Agradecimentos

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido a oportunidade de realizar o mestrado e ter me acompanhado em cada etapa de minha pesquisa, sempre me concedendo tranquilidade, confiança e sabedoria;

Aos meus pais e esposo por todo apoio e incentivo oferecidos constantemente;

À minha querida e amada orientadora Geusa Felipa por toda sua paciência, toda sua ajuda e palavras de incentivo que me motivaram e me fortaleceram durante esses dois anos de mestrado;

À minha querida co-orientadora Maria do Desterro, por todo conhecimento compartilhado e colaboração na pesquisa;

À Rita Carvalho, minha professora da graduação que me incentivou e contribuiu para minha entrada ao mestrado;

À Kátia Regina, Igor Pimentel e Rita Alves que me ajudaram nas etapas da pesquisa no laboratório;

À Amanda Mara Teles por ter me ajudado na extração do óleo e extrato e na análise química de ambos;

A banca examinadora por aceitar o convite de participar e por todas as contribuições colocadas;

Aos meus colegas da turma 15 que sempre profetizaram palavras de vitória, sucesso e encorajamento, e estiveram presentes em todos os altos e baixos da caminhada no mestrado;

À Universidade Federal do Maranhão por ter fornecido a estrutura física para realizar esta pesquisa;

Ao Programa de Mestrado em Saúde do Adulto (PPGSAD) pela acolhida e a oportunidade de evoluir cientificamente e profissionalmente.

“Se queres progredir, realizar seus sonhos, crescer na vida; então mude de paradigma, quebre os tabus e saia da zona de conforto; esta é a receita”. (J.Edson)

RESUMO

Introdução. *Cymbopogon citratus* é conhecida por suas atividades antifúngica, repelente de mosquitos, inseticida, antidiabética, anti-séptica, anti-mutagênica e anticancerígena, bem como anti-inflamatória. **Objetivo.** Avaliar a atividade do extrato e do óleo de *Cymbopogon citratus* sobre biofilmes de *Candida albicans* em superfícies abióticas. **Metodologia.** O extrato hidroalcólico da *Cymbopogon citratus* foi preparado seguindo o processo de Ramos *et al.* (2012) com algumas modificações. A extração do óleo essencial foi realizada a partir do material vegetal fresco pelo método de hidrodestilação, utilizando-se o sistema Clevenger. Fragmentos de cateter venoso central, sonda urinária e agulha foram submetidos a suspensão de *C. albicans* a 0,5 da escala de McFarland, no tempo de 24 e 48 horas para a formação de biofilme. Para avaliar a atividade antibiofilme e removedora de biofilmes de *C. albicans* utilizou-se a concentração de 500 µg do extrato e de 125 µg óleo de *C. citratus*. **Resultados.** *C. albicans* formou biofilmes de intensidade forte nas três superfícies abióticas, em 48 horas, em solução salina. Na atividade antibiofilme, o óleo e o extrato agiram de forma semelhante na superfície de sonda e agulha, no cateter venoso central o óleo teve uma inibição estaticamente significante comparado ao extrato. Na atividade removedora de biofilme nas superfícies abióticas, o extrato obteve ação semelhante ao controle positivo, entretanto, o óleo não apresentou ação removedora significante. **Conclusão.** *Candida albicans* colonizou os fragmentos de sonda urinária, cateter venoso central e agulha formando biofilmes na presença de solução salina 0,85% estéril. O óleo e extrato de *C. citratus* apresentou atividade antibiofilme e o extrato de *C. citratus* foi mais efetivo na remoção de biofilme.

Palavras-chave: *Candida albicans*. Biofilme. *Cymbopogon citratus*. Óleo. Extrato

ABSTRACT

Introduction. *Cymbopogon citratus* is known for its antifungal, mosquito repellent, insecticide, antidiabetic, antiseptic, anti-mutagenic, anticancer and anti-inflammatory activities. Aim. To evaluate the activity of *Cymbopogon citratus* extract and oil on *Candida albicans*' biofilms on abiotic surfaces. Methodology. The hydroalcoholic extract of *Cymbopogon citratus* was prepared according to Ramos *et al.* (2012) with some modifications. Extraction of the essential oil was performed from fresh plant material by the hydrodistillation method, using the Clevenger system. Fragments of central venous catheter, urinary tube and needle were subjected to suspension of *C.albicans* at 0.5 McFarland scale, at 24 and 48 hours for biofilm formation. To evaluate the antifungal and biofilm removal activity of *C. albicans* we used the concentration of 500 µg of extract and 125 µg of *C. citratus*' oil. Results. *C. albicans* formed strong intensity biofilms on the three abiotic surfaces in 48 hours in saline solution. In the antibiofilm activity, the oil and extract acted similarly on the probe and needle surface, while in central venous catheter the oil had a statistically significant inhibition compared to the extract. In the biofilm-removal activity of biofilm on abiotic surfaces, the extract acted similarly to the positive control; however, the oil did not show significant biofilm-removal action. Conclusion. *Candida albicans* ATCC colonized the vesical probe, central venous catheter and needle fragments, forming biofilms. *C. citratus*' oil and extract showed antibiofilm activity and *C. citratus*' extract was more effective in biofilm removal.

Keywords: *Candida albicans*. Biofilm. *Cymbopogon citratus*. Oil. Extract.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representação esquemática da morfologia de <i>Candida albicans</i> | 18 |
| Figura 2: Formação de biofilme por <i>C. albicans</i> | 20 |
| Figura 3: <i>Cymbopogon citratus</i> | 24 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|------|--|
| ATCC | American Type Culture Collection |
| BHI | Brain heart infusion |
| CN | Controle negativo |
| CP | Controle positivo ⁶ |
| CVC | Cateter venoso central |
| DMSO | Dimetilsufóxido |
| HIV | Vírus HIV |
| SIDA | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida |
| SVD | Sonda vesical de demora |
| HIV | Vírus da imunodeficiência |
| UFC | Unidade Formadora de Colônias |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 14 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 17 |
| 2.1 O gênero <i>Candida</i> | 17 |
| 2.1.1 <i>Candida albicans</i> | 17 |
| 2.2 Formação e desenvolvimento de biofilmes..... | 18 |
| 2.3 Medicamentos e resistência antifúngica..... | 20 |
| 2.4 Produtos naturais..... | 23 |
| 3 OBJETIVOS | 25 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 25 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 25 |
| 4 ARTIGO | 26 |
| 5 CONCLUSÕES | 42 |
| REFERENCIAS..... | 43 |
| ANEXO A- Normas da Revista | 49 |

1 INTRODUÇÃO

A Candidíase é uma doença causada pela *Candida*, é uma levedura que coloniza a microbiota normal da pele humana, do intestino e do trato urogenital. Entretanto, quando o sistema imunológico está debilitado devido a antibioticoterapia, diabetes mellitus, idade avançada, HIV/SIDA, uso de corticoides sistêmicos ou devido a fatores locais como o uso de próteses e a terapêutica corticoide inalada, a *Candida* pode tornar-se patogênica e ocasionar infecções cutâneas e invasivas, sendo a candidíase invasiva ou hematogênica a mais temida no ambiente nosocomial (SANDAI et al, 2016; JESUS, 2016; PINHATI, 2015).

Candida albicans é a principal responsável por infecções nosocomiais da corrente sanguínea na maioria dos estudos, em seguida estão *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Candida krusei* que são as responsáveis pelos demais casos (FULLER et al., 2019)

A candidíase invasiva é uma complicação infecciosa de difícil diagnóstico, acarreta no prolongamento do tempo de hospitalização, aumento dos custos hospitalares, além de possuir alto índice de mortalidade, de até 50% (PINHATI, 2015).

A *Candida albicans* possui uma grande capacidade de formar biofilmes em cateteres e diferentes implantes médicos permanentes, como sondas, próteses, entre outros (TSUI et al., 2016). Esses dispositivos representam fatores de risco significativos de candidíase invasiva, pois com a colonização por biofilmes, tornam-se uma fonte de infecção contínua ou recorrente da levedura. (KRETZER, 2015).

O biofilme é um conjunto de microrganismos sésseis incorporados em uma matriz extracelular polimérica, o qual possibilita aos microrganismos proteger-se da imunidade do hospedeiro, dos estresses do ambiente e do esgotamento nutricional, tornando-se assim um grave problema de saúde, pois são inerentemente resistentes à maioria dos tratamentos antifúngicos e também constituem um reservatório para infecção contínua (TOUIL; BOUCHERIT-OTMANI; BOUCHERIT, 2018; JESUS, 2016).

Mesmo com abordagens clínicas recentemente melhoradas, a infecção pelo biofilme ocorre em mais de 50% dos cateteres, e como conduta para sua erradicação é removido o dispositivo médico e administradas altas doses de antifúngicos (NOBILE et al., 2015).

Entretanto, os biofilmes fúngicos são em grande parte resistentes aos antifúngicos de amplo espectro. Em estudo realizado por Zarei *et al.* (2014) os biofilmes foram considerados tolerantes a anfotericina B e ao fluconazol, os antifúngicos mais utilizados para tratar e prevenir a candidíase sistêmica.

Devido à resistência aos antifúngicos disponíveis, nos últimos anos houve muitas pesquisas em busca de novos agentes para combater as infecções fúngicas, e os produtos naturais tem sido estudado como possível alternativa para eliminação dos biofilmes (Whaley et a., 2017; RAMAGE et al., 2012).

Cymbopogon citratus pertence à família Poacea, é originária da Índia, é popularmente conhecida no Brasil como capim-limão. Suas folhas são utilizadas pela população na forma de chá para alívio de pequenas cólicas uterinas e intestinais, má digestão, flatulência, insônia, nervosismo, como antitérmico, antiespasmódico e diurético. Seu efeito antifúngico está relacionado ao óleo essencial, contido em suas folhas. (SILVA, 2009).

O estudo realizado por Silva et al. (2009) utilizando o óleo de *Cymbopogon citratus* nas cepas de *Candida albicans* isoladas de infecções nosocomiais mostrou bons resultados, todas as cepas foram inibidas, confirmando a ação antifúngica do óleo. Outro estudo realizado por Madeira (2015) verificou o efeito *in vitro* do extrato de capim limão em biofilmes de *Candida albicans*, os resultados mostraram que os biofilmes formados pelo fungo foram reduzidos.

Neste estudo foi selecionada a pesquisa da formação de biofilme por *Candida albicans* em cateter venoso central, sonda urinária e agulha metálica (representando uma prótese) em virtude dessas superfícies abióticas serem frequentemente utilizadas em procedimentos terapêuticos tanto em pacientes imunocompetentes, quanto em pacientes imunocomprometidos. Assim objetivou-se avaliar a atividade antibiofilme e removedora de biofilmes de *C. albicans* do extrato e do óleo de *Cymbopogon citratus*.

Justifica-se esta pesquisa como uma busca de novas alternativas terapêuticas com produtos naturais que possam viabilizar a inibição das infecções nosocomiais micológicas, principalmente aquelas causadas pela produção de biofilme por *Candida albicans*, em virtude da sua alta incidência e do aumento significativo da resistência aos antifúngicos disponíveis no mercado.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O gênero *Candida*

O gênero *Candida* é composto por leveduras que existem predominantemente na forma unicelular e se reproduzem assexuadamente e sexuadamente. Existem mais de 150 espécies, contudo menos de 10% delas apresentam patogenicidade para os humanos. Algumas dessas espécies fazem parte da microbiota do homem, habitando as mucosas, a pele, os tratores respiratório e gastrointestinal. A conversão de levedura comensal para agente causador de infecções acontece frequentemente em ambiente hospitalar e quando o sistema imunológico do indivíduo está comprometido, ocasionando desde infecções com lesões irritativas de mucosas até invasão sistêmica de órgãos e tecidos com disseminação na corrente sanguínea (JABRA-RIZK, 2016; KRETEZER, 2015; TSUI; KONG; CLEVELAND et al., 2015).

Pacientes imunocomprometidos e pacientes com dispositivos médicos implantados (cateteres, válvulas cardíacas, marca passos cardíacos, tubos endotraqueais, próteses articulares) são altamente suscetíveis a infecções por *Candida* (HAQUE et al., 2016; CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2012).

As espécies de *Candida*, sobretudo a *C. albicans*, têm surgido como perigosos patógenos, estando associados a quase 80% de todas as infecções fúngicas nosocomiais. *C. albicans* é a espécie mais relacionada à maioria das infecções em humanos, porém as espécies “não albicans”, como *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. guilliermondii* e *C. lusitaniae*, têm sido frequentemente identificadas como agentes oportunistas em pacientes hospitalizados (PURISCO, 2010; MARESCA et al., 2013).

2.1.1 *Candida albicans*

Candida albicans pertence ao reino Fungi, filo Ascomycota e classe Saccharomycetes é um dos agentes patogênicos que ocasionam a candidíase no homem, é a espécie mais estudada e constantemente isolada, em função de sua elevada prevalência. Este fungo dimórfico pode ser comensal ou oportunista, ocasionando infecções superficiais ou sistêmicas (NETT; ANDES, 2006; SEABRA, 2011). Apresenta duas formas de crescimento, células ovais individuais (células de levedura ou blastósporos) ou longas células filamentosas ligadas de ponta a ponta (pseudo-hifas ou hifas) (DESAI; MITCHELL, 2015) (Figura 1).



Figura 1: Representação esquemática da morfologia de *C. albicans*. Adaptado de Thompson et al., 2011

As pseudo-hifas são morfologicamente distinguíveis das hifas porque as pseudo-hifas têm constricções nos locais de septação e são mais largas que as hifas. Em contrapartida, as hifas formam filamentos longos, semelhantes a tubos, com lados completamente paralelos e sem constricções no local da septação (SUDBERY, 2011). A transformação de levedura para hifas é um reconhecido fator de virulência de *C. albicans*, visto que está associada à formação do biofilme (TOUIL; BOUCHERIT-OTMANI; BOUCHERIT, 2018).

Nas infecções da mucosa, as formas de hifas invadem as células epiteliais e endoteliais e causam lesões, pois liberam enzimas hidrolíticas. Para ocasionar a candidemia, que é a infecção de corrente sanguínea por *Candida*, as hifas precisam penetrar as barreiras da mucosa e a infecção dos órgãos internos requer invasão dos endotélios (SUDBERY, 2011).

C. albicans é uma das principais causas de infecções hospitalares, sendo responsável por 15% de todos os casos de sepse e é a causa de 40% das infecções

da corrente sanguínea em contextos clínicos. Embora *C. albicans* possa infectar indivíduos imunocompetentes e imunocomprometidos, estes tendem a ter infecções mais graves, nesse grupo estão incluídos pacientes com síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA), pacientes submetidos a quimioterapia ou terapias de imunossupressão, bem como indivíduos com dispositivos médicos implantados (GULATI; NOBILE, 2016).

2.2 Formação e desenvolvimento de biofilmes

Biofilmes são comunidades de organismos sésseis irreversivelmente associados a uma superfície, envoltos por uma matriz extracelular rica em polissacarídeos (CHANDRA; MUKHERJEE, 2015). Este ambiente propicia muitos benefícios aos microrganismos, como a proteção das defesas do sistema imunológico, disponibilidade de nutrientes, resistência ao estresse químico e aos medicamentos existentes (TOUIL; BOUCHERIT-OTMANI; BOUCHERIT, 2018; VIPULANANDAN *et al.*, 2018). O desenvolvimento do biofilme é influenciado pelo tipo e o número de células que aderem ao dispositivo, o tipo de superfície que o constitui e o meio ou fluido em que os microrganismos são expostos (GIONGO *et al.*, 2016).

O uso de dispositivos médicos, como cateteres, marca-passos, próteses valvulares cardíacas e próteses articulares, aumentou substancialmente nos últimos anos. Esses dispositivos podem ser colonizados por microrganismos que formam biofilmes. As infecções relacionadas a implantes são difíceis de resolver, porque os microrganismos de biofilme são resistentes tanto aos mecanismos de defesa do hospedeiro quanto ao uso de diferentes classes de medicamentos (MANOHARAN *et al.*, 2017).

C. albicans produz biofilmes bem estruturados constituído por células em forma de levedura redondas (brotamento); células ovais (pseudo-hifas) e células cilíndricas alongadas (hifas) encobertas por uma matriz extracelular (NOBILE; JOHNSON, 2015).

O processo de desenvolvimento de biofilme de *C. albicans* pode ser dividido em quatro etapas principais: aderência, proliferação, maturação e dispersão. A etapa de aderência consiste na adesão de células de leveduras a superfície do material formando uma camada basal que irá ancorar o biofilme à superfície. Em seguida há uma proliferação de células em toda a superfície e filamentação em que as células formam projeções alongadas que continuam a crescer nas formas de hifas filamentosas (etapa de proliferação). O arcabouço de hifas fica envolto em um manto de substâncias exopoliméricas autopropulsoras, matriz extracelular, que atuam como uma cola adesiva que mantém toda a estrutura do biofilme em conjunto (etapa de maturação). Na última etapa (dispersão), células de leveduras que não conseguiram aderir são liberadas do biofilme para o entorno, onde podem colonizar outras superfícies (WALL *et al.*, 2019; MANOHARAN *et al.*, 2017; TSUI, C; KONG; JABRA-RIZK, 2016) (Figura 2).

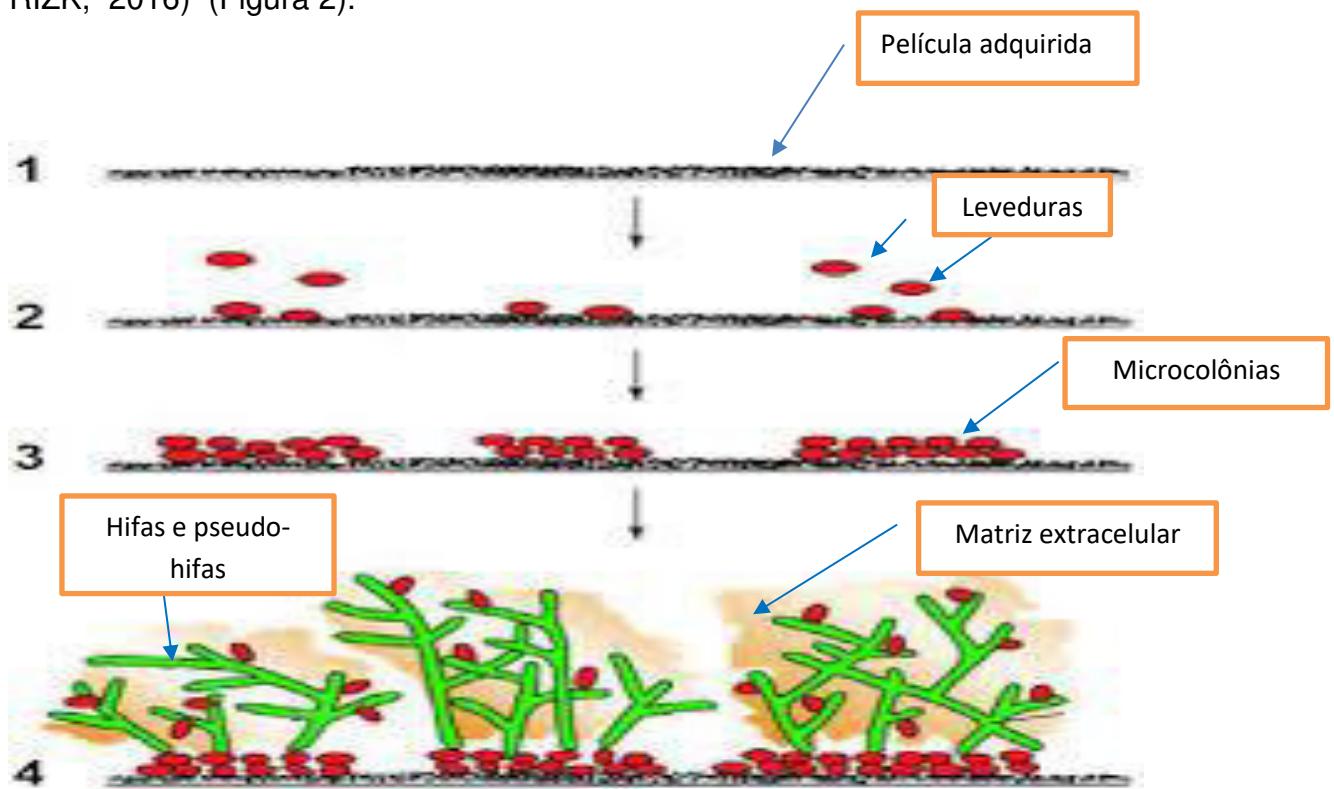


Figura 2: Formação de biofilme por *C. albicans*. Adaptado de Douglas, 2003

A formação de biofilmes contribui para a candidíase superficial e sistêmica e para a dificuldade na terapia antifúngica atual (CHANDRA; MUKHERJEE; GHANNOUM, 2012). De fato, os biofilmes de *Candida* são resistentes a muitos

agentes antifúngicos (RAMAGE *et al.*, 2012). Nos últimos anos, tem havido um grande esforço na busca de novos agentes para combater esse tipo de infecção fúngica, e os produtos naturais surgem como alternativas (GIONGO *et al.*, 2016; MANOHARAN *et al.*, 2017; KHAN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2018).

2.3 Antifúngicos

Antifúngicos são medicamentos utilizadas no tratamento das infecções fúngicas, estas frequentemente são tratadas com antifúngicos pertencentes às categorias dos azóis (clotrimazol, fluconazol, itraconazol, cetoconazol), polienos (anfotericina B, nistatina) e equinocandinas (caspofungina, anidulafungina, micafungina) (WILLIAMS *et al.*, 2011).

Os polienos atuam interagindo com o ergosterol presente na membrana celular do fungo, para formar canais pelos quais os componentes citoplasmáticos vitais irão escapar do interior da célula fúngica para o exterior, levando à morte do organismo. As equinocandinas interrompem a biossíntese de 1,3- β -D-glucana, um componente chave da parede celular fúngica, a partir da inibição da 1,3- β D-glucan sintase. Isto promove a formação celular com defeitos associada à instabilidade celular e à lise da levedura (ZIDA *et al.*, 2016).

Os azólicos atuam inibindo a enzima fúngica lanosina-14 α -desmetilase, que é responsável pela conversão de lanosterol em ergosterol, afetando diretamente a fluidez da membrana e nas enzimas ligadas a ela (CHUDZIK *et al.*, 2015).

A resistência antifúngica é um processo evolutivo baseado na seleção natural de organismos que produzem diversas estratégias para combater a ação de drogas e representa um grande obstáculo para os clínicos que buscam tratar efetivamente as infecções por *Candida* (VIPULANANDAN *et al.*, 2018; CAMPOY; ADRIO, 2017).

Os microrganismos para neutralizar a ação de todas as classes de antifúngicos criaram três mecanismos principais de resistência. O primeiro refere-se à diminuição

da concentração efetiva do fármaco, o segundo alterando o alvo do fármaco e o terceiro modificando o metabolismo no intuito de desviar os efeitos tóxicos de alguns antifúngicos (SANGLARD, 2016; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

Para reduzir a concentração intracelular do fármaco é aumentado o seu efluxo. Nos fungos, dois sistemas de efluxo do fármaco estão envolvidos: a Superfamília dos Cassetes Ligantes ao ATP e a Superfamília Facilitadora Principal (TOBUDIC; KRATZER; PRESTERL, 2012).

CDR1 e CDR2 são os principais transportadores da Superfamília dos Cassetes Ligantes ao ATP envolvidos na resistência a azóis em *C. albicans* (SARDI; ALMEIDA; MENDES GIANNINI, 2011; MISHRA *et al.*, 2007). O MDR1 é o transportador da Superfamília Facilitadora Principal envolvido no desenvolvimento da resistência a azóis em isolados clínicos de *C. albicans* e *C. dubliniensis*. E a FLU1 da *C. albicans* é o transportador envolvido na resistência ao fluconazol (MOGAVERO *et al.*, 2011).

Outra maneira de diminuir a concentração efetiva do fármaco é a superexpressão do ERG11 (gene que codifica a lanosterol 14 α -desmetilase) e / ou outros genes da biossíntese do esterol, como ERG1, ERG3, ERG7, ERG9 ou ERG25 que codificam enzimas C14 α -desmetilase, a regulação positiva desses genes ocasiona a resistência a azóis. A presença de biofilme, também é um mecanismo de redução da concentração efetiva do fármaco, pois este restringe a penetração do fármaco na célula fúngica (CAMPOY; ADRIO, 2017).

Alteração no alvo de drogas é outro mecanismo pelo qual os fungos são capazes de desenvolver resistência, este mecanismo é relatado nos azóis e equinocandinas. Em *C. albicans*, mutações no ERG11 diminuem a afinidade pelos azóis ocasionando a resistência. A resistência à equinocandina é associada a mutações pontuais nos genes FSK1 ou FSK2 (SANGLARD, 2016; VANDEPUTTE; FERRARI; COSTE, 2012).

O terceiro mecanismo de resistência dos fungos é por meio da modificação de vias metabólicas que promovem a perda ou a forte redução de sua função específica. Modificação das etapas finais da biossíntese do ergosterol por meio da inativação do

gene ERG3, resulta na ausência de produção de esteróis metilados tóxicos que levam à resistência cruzada a todos os fármacos azóis (SANGLARD, 2016).

O biofilme é um fator que contribui para a resistência a antifúngicos, pois torna os microrganismos menos suscetível aos mecanismos de defesas do hospedeiro e a ação dos antifúngicos, dificultando o tratamento e contribuindo para altas taxas de mortalidade e morbidade (COSTA-ORLANDI *et al.*, 2014; GRISHING; KARYAGINA, 2019).

Os antifúngicos comumente prescritos, fluconazol e anfotericina B são ineficazes contra certos biofilmes de *C. albicans* ou devem ser usados em altas concentrações o que ocasiona efeitos adversos graves (hepatotoxicidade, nefrotoxicidade) (MANOHARAN *et al.*, 2017). Não há no mercado nenhum medicamento específico para atuar sobre biofilmes de *C. albicans* (ou qualquer outro microrganismo), tornando o tratamento de infecções baseadas em biofilme um grave problema de saúde pública (NOBILE; JOHNSON, 2015). Por isso, é de suma importância a busca de novos agentes antifúngicos que atuem na inibição da formação de biofilmes.

2.4 Produtos naturais

Nas últimas décadas, o interesse por produtos naturais expandiu e as plantas medicinais, seus extratos e óleos foram pesquisados quanto às suas propriedades antifúngicas e como possíveis novos agentes antifúngicos (KAOMONGKOLGIT, JAMDEE, 2016; CASTILLO, ASCURRA, SOTOMAYOR, 2019).

Uma das plantas medicinais mais cultivadas e consumidas em medicina tradicional é o *Cymbopogon citratus* (Figura 3). Esta planta pertence à família Poacea, é originária da Índia, e é popularmente conhecida no Brasil como capim-limão, capim-cidreira, capim-santo, entre outros (VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014; ZUCCHI *et al.*, 2013; SILVA *et al.*, 2009). *C. citratus* é conhecida por suas atividades

antifúngica, repelente de mosquitos, inseticida, antidiabética, anti-séptica, anti-mutagênica e anticancerígena, bem como anti-inflamatória (COSTA *et al.*, 2016).

O óleo obtido das folhas frescas da planta é utilizado nas mais diversas áreas, como na indústria farmacêutica, alimentícia e de cosméticos. Para a indústria farmacêutica sua importância está nos seus vários efeitos farmacológicos e clínicos nas infecções bacterianas, fúngicas, como sedativo, anti-inflamatório e oxidante (ALDAWSARI *et al.*, 2015).

As atividades antifúngicas do óleo de *C. citratus* podem ser atribuídas à presença de vários constituintes, incluindo citral, β -mirceno, linalol e geraniol (EKPENYONG, AKPAN, NYOH, 2015).

A atividade antifúngica do *Cymbopogon citratus* nas mais variadas formulações, como óleo essencial, extratos hidro-alcóolicos, citral, está bem determinada e os presentes resultados corroboram a literatura (MADEIRA *et al.*, 2016; ARMORNVIT, CHOONHARUANGDEJ, SRITHAVAJ, 2014; KORENBLUM *et al.*, 2013; Khan *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2009).



Figura 3: *Cymbopogon citratus*.

Fonte: autora

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade do extrato e óleo de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) sobre biofilmes de *C. albicans* em superfícies abióticas.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter extrato hidroalcolico e óleo das folhas de *Cymbopogon citratus*;
- ✓ Induzir *in vitro* a formação de biofilme por *Candida albicans* em superfícies abióticas (sonda vesical de demora, cateter venoso central e agulha metálica);
- ✓ Estudar *in vitro* o efeito antibiofilme e removedor de biofilme do extrato hidroalcolico e óleo de *Cymbopogon citratus* em sonda vesical de demora, cateter venoso central e agulha metálica.

4 ARTIGO

4.1 Recibo e artigo submetido

Qualis: A3

Fator de impacto: 2.746



ACTIVITY OF THE EXTRACT AND OIL FROM *Cymbopogon citratus* on *Candida albicans*' BIOFILMS

| | |
|--|--|
| Journal: | <i>Future Microbiology</i> |
| Manuscript ID | FMB-2019-0248 |
| Manuscript Type: | Abstracts |
| Keywords: | <i>Candida albicans</i> , Biofilm, <i>Cymbopogon citratus</i> , Oil, Extract, Anti-biofilm |
| <p>Note: The following files were submitted by the author for peer review, but cannot be converted to PDF. You must view these files (e.g. movies) online.</p> | |
| <p>Manuscript Jessica.docx</p> | |

INTRODUCTION

The use of natural products for medicinal purposes remains a promising area for new drugs. *Cymbopogon citratus*, popularly known in Brazil as lemongrass, is rich in antifungal, antibacterial, insecticide, antidiabetic, antiseptic, anti-mutagenic and anticancer properties [1,2].

Cymbopogon citratus is native of India and belongs to the Poacea family. It contains a variety of compounds such as terpenes, flavonoids and alkaloids, depending on the habitat. The properties of oil, better known than those of the extract, have broad medicinal activity being used to cure various diseases such as cough, cold, rheumatism, digestive problems, bladder problems and is also used as antiseptic agent [3]. The biofilm removal properties of *C. citratus* are poorly studied. The antibiofilm oil properties are better understood and it contains a high antifungal value [4].

Candida albicans is present in the normal microbiota, colonizing asymptotically the gastrointestinal tract, reproductive tract, oral cavity and skin of most part of healthy humans. However, alterations in the immune response of the host, in the host's microbiota or variations in the local microenvironment may propitiate the proliferation and consequent infection by *C. albicans* [5,6,7]. Infections vary from superficial to hematogenously disseminated, having high morbidity rates, approaching 40% in some cases [8].

Biofilms represent one of the main virulence factors of a microorganism and it is a protective factor to them. It is composed of sessile cells and extracellular matrix, both providing pathogenicity to these pathogens. In addition, it prevents antifungal action and increases resistance to chemical stress and nutrient availability [9,10,11].

Candida albicans has a great ability to form biofilms in catheters and different permanent medical implants, such as probes, prostheses, among others [12]. These devices represent significant risk factors for invasive candidiasis, because with biofilm colonization they become a source of continuous or recurrent yeast infection [13].

Nosocomial infections can usually be triggered by biofilms formed in medical devices such as urinary catheters, central venous catheters (CVC) and orthopedic prostheses, contributing to the high mortality rate associated with these infections [14]. *Candida* biofilms are extremely tolerant to common antifungals and the immune system. More than ten million patients annually receive devices (venous catheters, urinary catheters, artificial joints) and when infected, surgical removal is the only therapeutic option [15]

Therefore, this study aimed to evaluate the formation of *Candida albicans* biofilms in urinary tube, central venous catheter and metallic needle and the action of *Cymbopogon citratus* extract and oil on these biofilms.

Materials & methods

Cymbopogon citratus leaves were collected in the Herbarium of Federal University of Maranhão (latitude: 02° 33 221' S, longitude: 44° 18 340' W), located in São Luís- Maranhão, under the registration number 1216.

Candida albicans ATCC 443802-02 strain used in this research was obtained from the Collection of Fungi of Federal University of Maranhão.

Preparation of hydroalcoholic extract

The hydroalcoholic extract of *Cymbopogon citratus* was prepared following the process of Ramos *et al.* [16] with some modifications.

The leaves were weighed and resulted in 621.9 g of *C. citratus*. They were then grounded and mixed in an amber flask with 1 liter of 90% ethyl alcohol. This mixture was stored in an amber flask in a dark place for twelve days and stirred 1x daily. After this time, the mixture was filtered and concentrated on rotary evaporator. The yield of

the extract was expressed as a percentage in the mass/mass ratio, by the weighted measure of the plant and the measure of the obtained mass of the extract.

Preparation of Essential Oil

Extraction of the essential oil was performed from fresh plant material by the hydrodistillation method, using the Clevenger system. Approximately 500 g of *C. citratus* leaves were used in this process and the mass was then transferred to a round bottom flask (6000 mL) and distilled water 1:10 added.

The extraction was carried out over a period of four hours and then the obtained essential oil was separated from the hydrolate by the addition of anhydrous sodium sulfate, followed by storage in an amber glass bottle under refrigeration at - 4 ° C to avoid possible loss of constituents.

After oil and extract were prepared, 0.10 g of both were weighed separately and diluted with 100 µL of 1% dimethylsulfoxide resulting in a concentration of 100.000 µg / mL. From this concentration, concentrations of 1000 µg, 500 µg, 250 µg, 125 µg, 62.5 µg, 31.25 µg, 15.6 µg, 7.8 µg were prepared.

Chemical composition analysis of *Cymbopogon citratus* extract and oil.

The constituent analysis of the essential oil of *Cymbopogon citratus* was performed at the Analytical Instrumentation Center of the University of São Paulo by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC / MS).

The spectrophotometric determination of phenolic compounds was performed according to the methodology described by Waterhouse [17], using the Folin-Ciocalteu reagent. The calibration curve was obtained by using six tannic acid dilutions (10-120 µg/L). The samples under analysis were submitted to the same procedure. Absorbance

measurements as a function of concentration were made on a UVVIS Quimis spectrophotometer at 760 nm in triplicate.

Assay of biofilm formation

Biofilm assays and their intensity classification were performed according to Borges *et al.*, Ramage *et al.* and Silva *et al.* [18,19, 20] with adaptations.

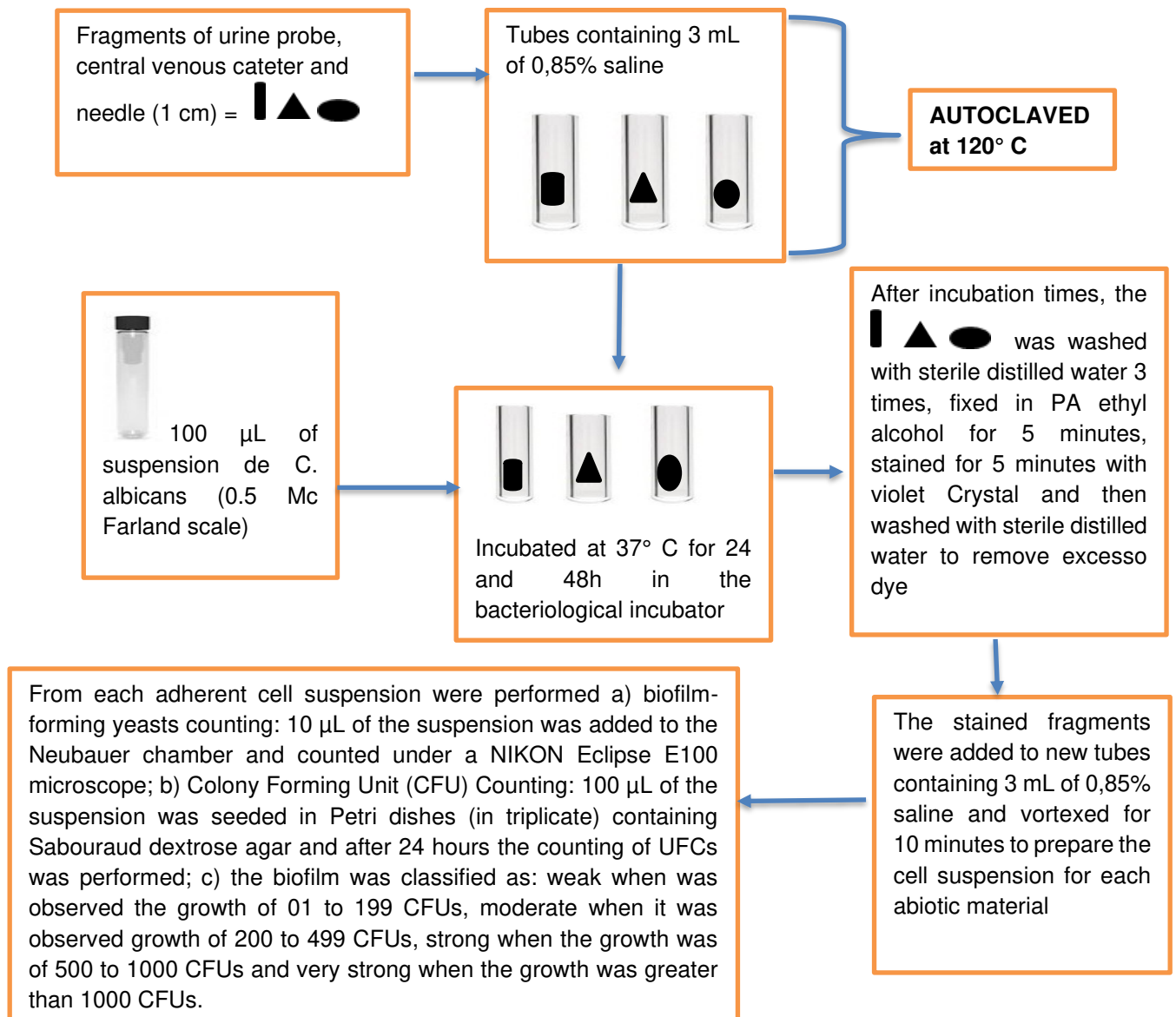


Figure 1. Fluxogram of Assay of biofilme formation

Antibiofilm action of *Cymbopogon citratus* oil and extract in abiotic surfaces

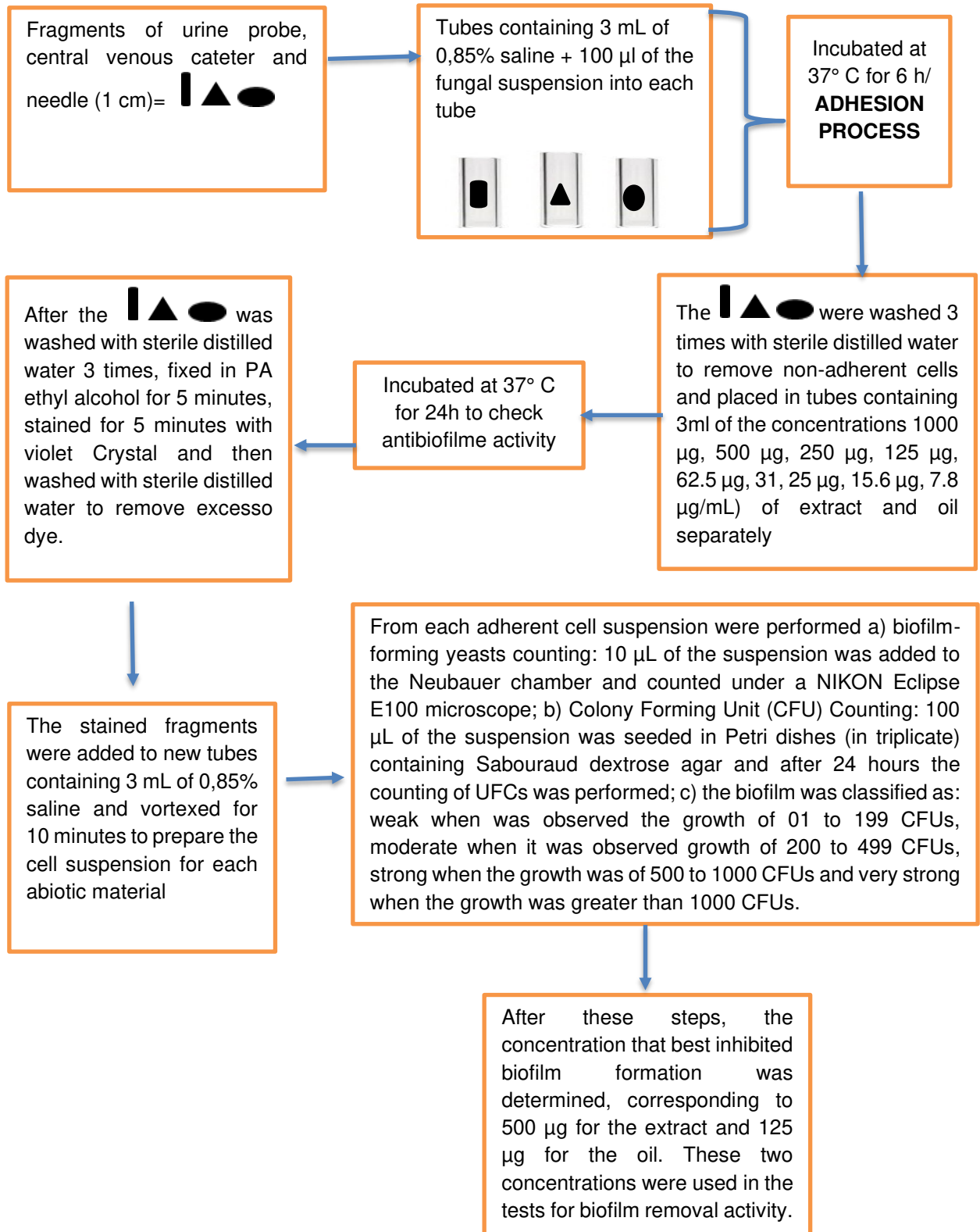


Figure 2. Antibiofilm action of *Cymbopogon citratus* oil and extract in abiotic surfaces

Biofilm removal action of *Cymbopogon citratus* oil and hydroalcoholic extract in abiotic surfaces

This assay was performed after 48-hour biofilm formation on abiotic surfaces following the procedures cited to form biofilm. Subsequently, the fragments were washed, fixed and stained, then placed in tubes containing 3 ml extract at a concentration of 500 µg/mL and 3 mL of oil at a concentration of 125 µg/mL, leaving them incubated for 24 hours at room temperature 29° C. As a positive control for removing action the 33% acetic acid solution.

After 24 hours of product action, the number of cells that were detached from abiotic surfaces was counted by placing 10 µl aliquot of each tube in a Neubauer chamber and 100 µL seeded in Petri dishes (in triplicate) containing Sabouraud dextrose agar and incubated 24 hours at 37 ° C in a bacteriological incubator for counting of CFUs.

Statistical analysis

The data were evaluated by Stata and Prism 7 Programs. The utilized tests were Shapiro-Wilk and ANOVA one-way with post-hoc of Tukey. The adopted level of significance in all tests was 5%, in other words, the values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Mass spectrometric analysis revealed that *Cymbopogon citratus* oil had the major constituents of 43.96% Epoxy-Linalooloxide, 35.71% β-citral, 8.6% Geranyl acetate and lower compositions ranging from 1 to, 24 to 0.31% VerbenolMycene, L-

linalool, Neral, Nerolic Acid, Isobutyl Acetate, Geranial, Isoamyl Nerolate and Cyclopropanemethanol (Table 1).

| Peak ¹ | T _R ² | Compounds | %A ³ |
|-------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------|
| 1 | 4,293 | Verbenol | 1,24 |
| 2 | 4,350 | Mycene | 2,71 |
| 3 | 4,469 | L-linalool | 0,31 |
| 4 | 6,000 | --- | 0,23 |
| 5 | 6,043 | Neral | 0,90 |
| 6 | 6,743 | Nerolic Acid | 0,83 |
| 7 | 7,262 | Isobutyl acetate | 0,42 |
| 8 | 8,367 | β-citral | 35,71 |
| 9 | 8,562 | Geranial | 1,28 |
| 10 | 8,875 | Epoxy- Linalooloxide | 43,96 |
| 11 | 9,100 | Geranyl Acetate | 8,61 |
| 12 | 10,174 | -- | 0,56 |
| 13 | 11,774 | -- | 0,41 |
| 14 | 19,053 | -- | 0,77, |
| 15 | 19,135 | -- | 0,55 |
| 16 | 19,275 | Isoamyl Nerolate | 0,54 |
| 17 | 19,657 | -- | 0,24 |
| 18 | 19,717 | Cyclopropanemethanol | 0,44 |
| 19 | 20,090 | -- | 0,31 |

Table 1. Chemical composition of *C. citratus* essential oil based on the chromatogram.

C. citratus' extract showed yield of 3.45% and contents of phenolic compounds of 152.82 mg EAT.g⁻¹.

Biofilm in abiotic surfaces

The data reveal that *Candida albicans* was able to form biofilm on urinary probe, needle and central venous catheter surfaces. These data show the affinity *C. albicans* has for abiotic surfaces such as silicon latex (urinary tube material), metal (needle

material) and polystyrene (central venous catheter material) being able to colonize on such surfaces within 48 hours (Figure 3, 4A). In the studied surfaces, it was possible to observe, at 24hs, the weak intensity in the needle, moderate in urinary tube and central venous catheter, while in 48hs, the biofilm intensity evolved to strong in all materials (Figure 4B)

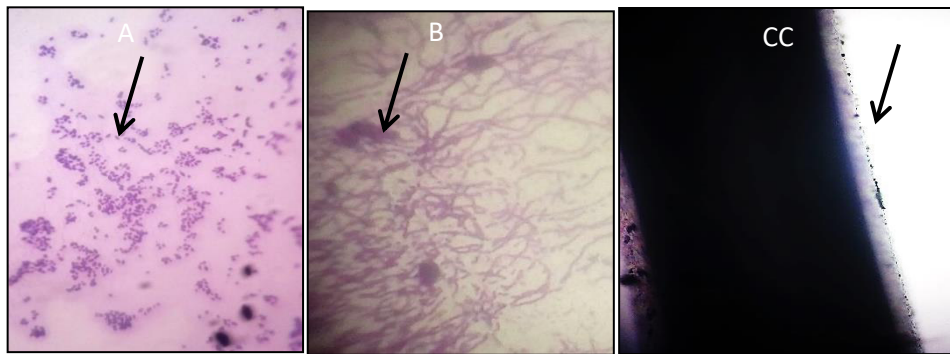


Figure 3. Microscopy of 24 hours-biofilm. (A) In venous central catheter **(B)** in urinary probe **(C)** in needle, under 40x objective.

Antibiofilm action of *C. citratus* oil and hydroalcoholic on abiotic surfaces

Concentrations of 7.5 to 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of extract and oil were evaluated on biofilm formation. After data analysis it was observed that the best concentration of the extract that prevented biofilm formation was 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and for the oil was 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

The action of the extract on the 24h-biofilm was statistically significant on the three abiotic surfaces. In the counting of yeasts that make up the control biofilm, statistic shows that when the number of yeasts of the standard biofilm formed on the abiotic surfaces was compared to the number of yeasts of the biofilm formed in the presence of the extract at a concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$, there was an inhibition on the biofilm formation. In the urinary probe there was an inhibition in the development of biofilm of 67.27% with $p = <0.05$, in the needle, 51.17% with $p = 0.1$ and in central venous catheter 34.8% of inhibition on the formation of biofilm with $p <0.05$. The oil at 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was able to reduce the number of yeasts on the probe surface by 68.6% with $p <0.05$, the needle was able to inhibit 67.5% with $p <0.05$ and central venous catheter inhibited 81.5% of the biofilm with $p <0.05$ (Figure 4C).

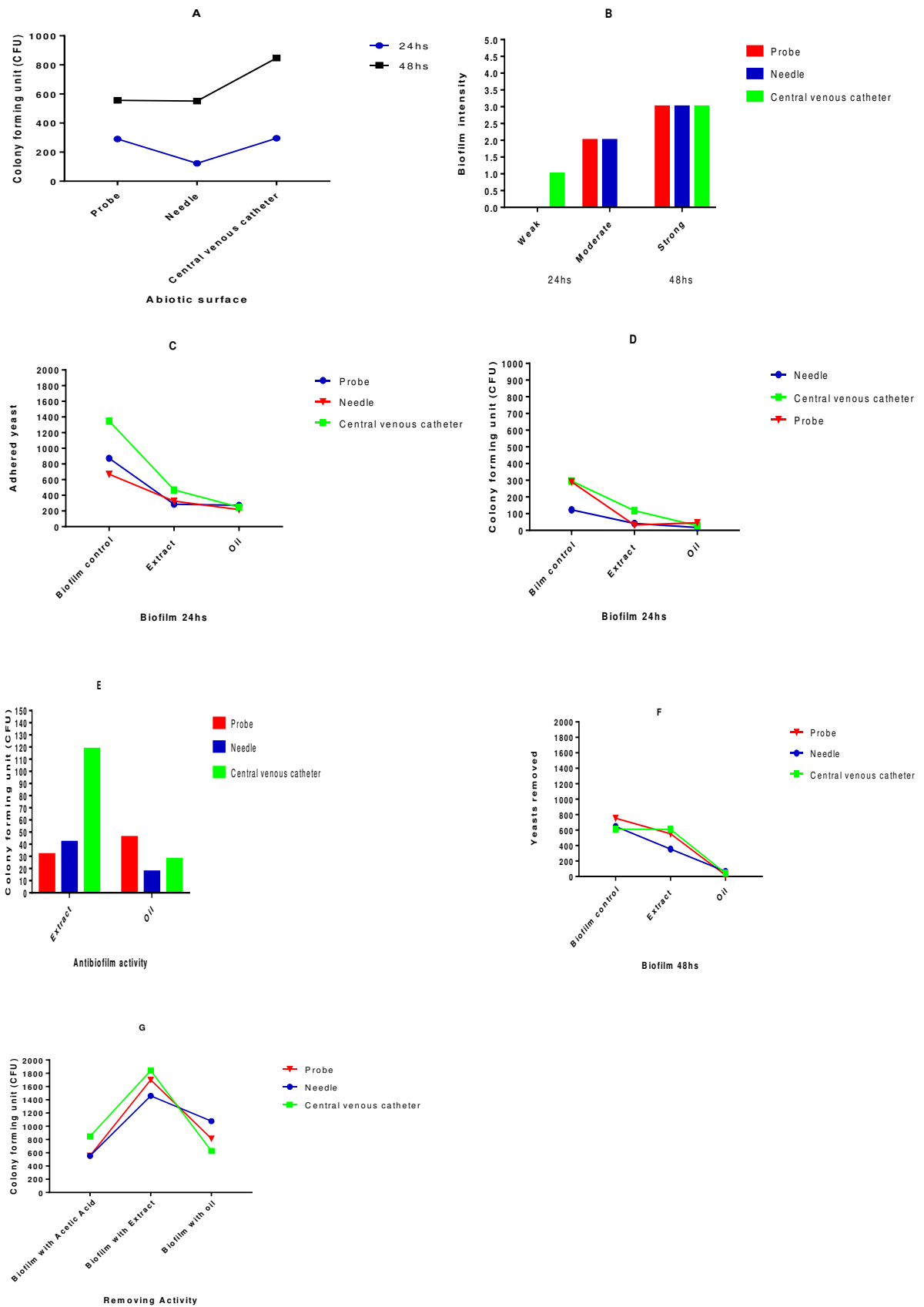


Figure 4. (A) Biofilm maturing of *C. albicans* between 24 and 48 hours; (B) Intensity of biofilm between 24 and 48 hours; (C) Influence of extract and oil on *C. albicans*' biofilme formation on abiotic surfaces about adhered yeasts; (D) Influence of extract and oil on *C. albicans*' biofilme formation on abiotic surfaces about CFU; (E) Comparative analysis of antibiofilme activity between extract and oil about CFU; (F) Biofilme-removal activity of the extract and oil on *C. albicans*' biofilme on abiotic surfaces about removed yeasts; (G) Biofilme-removal activity of the extract and oil on *C. albicans*' biofilme on abiotic surfaces about CFU

When comparing CFU, within 24 hours, in the absence and presence of the extract, a statistically significant difference is evident. In the presence of the extract biofilm formation was inhibited by 89.1% in the urinary tube ($p < 0.05$), in central venous catheter 59.8% with $p < 0.05$ and in the needle prevented 66.23% ($p < 0.05$). By analyzing the influence of the oil it was observed that the inhibition of biofilm formation in the probe was 84% ($p < 0.05$), in the metallic needle the inhibition was 96% ($p < 0.05$), while in central venous catheter the inhibition was 59.8% with $p < 0.05$ (Figure 4D).

When comparing the extract and oil antibiofilm activity by CFU, it is clear that the oil and extract had antibiofilm activity. In the probe and needle there was no statistically significant difference between extract and oil ($p = 0.99$), demonstrating that both acted similarly, and in central venous catheter the oil was more effective than the extract ($p < 0.05$) (Figure 4E).

Removal action of *Cymbopogon citratus* oil and hydroalcoholic extract on abiotic surfaces

The figure 5 shows the difference between extract and oil regarding the biofilm-removal capacity. It is possible to observe the yeasts detaching (arrow) from the fragments in both, but visually it is observed that the extract removes more yeasts than the oil.

Cymbopogon citratus extract showed good removal activity. When comparing the removal activity of the extract with the positive control (acetic acid 33%) in relation to the detached biofilm yeasts, in the three abiotic materials the extract acted similarly to the acetic acid with $p = 0.07$ in the needle, $p = 1.00$ central venous catheter and $p = 0.4$ in the urinary probe (Figure 4F).

Regarding the oil, a low removal capacity of biofilm yeasts with $p < 0.05$ was observed in all three materials compared to acetic acid 33%. Therefore, the oil did not show satisfactory biofilm-removal activity (Figure 4F).

In relation to the CFU, the extract also showed a biofilm removing action on the three abiotic surfaces compared with acetic acid ($p < 0.05$) (Figure 4G).

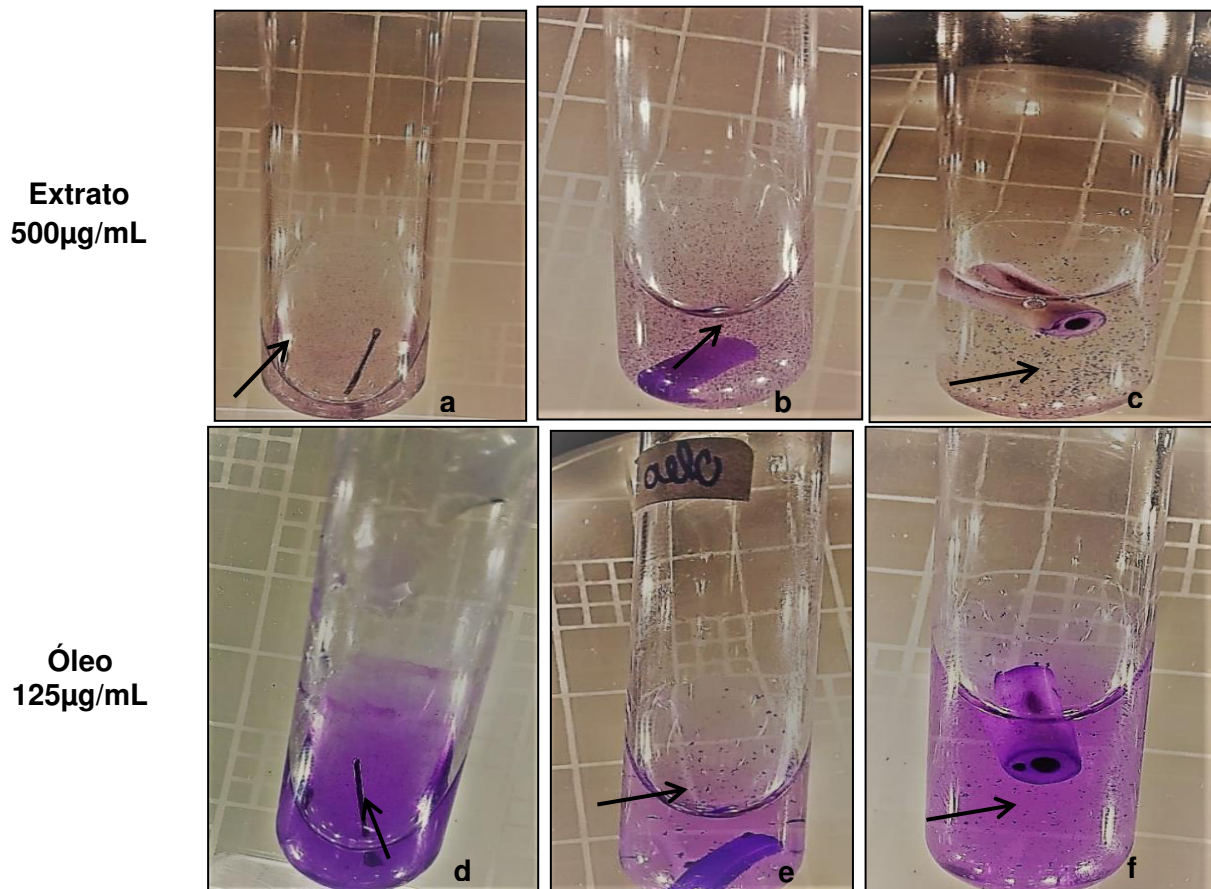


Figure 5. Biofilm-removal activity of *C. citratus* extract and oil on *C. albicans*' biofilm on abiotic surfaces of needle, urinary probe and central venous catheter. The action of the extract: a) needle; b) central venous catheter; c) urinary probe. Oil action: d) needle; e) central venous catheter; f) urinary probe.

Discussion

This *in vitro* study demonstrated the ability of *C. albicans* to form biofilms on abiotic surfaces of central venous catheter, urinary probe and needle, materials often used in patients undergoing invasive treatments. Studies addressing biofilm formation by *C. albicans* in the literature are generally performed in 96-well microplates with fungal mass absorbance reading, unlike the present study that used medical materials commonly used in patients [21,22, 23, 24, 25]. Another aim of this work was to demonstrate the action of *C. citratus*' extract and oil against *C. albicans*' biofilms. In

most of the scientific researches this action is demonstrated individually, without a comparison between the two products.

This study revealed the antibiofilm activity of *C. citratus*' extract and oil in medical devices, corroborating research by Kahn and Ahmad [23] and Taweechaisupapong *et al.* [23] who used abiotic 96-well microplate surfaces and found that *C. citratus* had inhibitory biofilm formation activity.

At 125 µg, our *C. citratus* oil inhibited 84.3% of biofilm formation in the urinary probe; 86.22% in the needle and 90.63% in the central venous catheter, revealing its antibiofilm action. Studies by Kahn and Ahmad [23] evaluated the action of oil at 90 µg and 45 µg concentrations in *Candida albicans* ATCC strains in 96-well microplates, and the results demonstrated inhibition of biofilm growth in 82.2% and 75.33% respectively, similar results to those found in this work.

In the case of *C. citratus* extract, at a concentration of 500 µg/mL, this study reduced 59.89% of biofilm cells in the central venous catheter, 89.11% in the urinary tube and 66.23% in the needle. Madeira *et al.* [26] demonstrated that *C. citratus* extract at a concentration of 625 µg/mL reduced approximately 90% of biofilm cells formed by *C. albicans* in acrylic resin. Our extract similarly reduced biofilm formation at a lower concentration.

There are still few studies with natural products that study the biofilm removal activity, most of them address the antibiofilm activity of extracts, oils and antifungals. This study evaluated the *C. citratus* extract and oil removal activity in *C. albicans* biofilms on abiotic surfaces. *C. citratus* extract at a concentration of 500 µg / mL was able to remove the biofilm formed in probe, catheter and needle.

Comparing the extract with the 33% acetic acid (positive control), on the three abiotic surfaces, the extract showed similar removal activity to acetic acid. However, *C. citratus* oil showed no significant biofilm removal capacity.

The antifungal activity of *C. citratus* in the most varied formulations, such as essential oil, hydroalcoholic extracts, citral, is well determined and the present results corroborate the literature [26,27,28, 29].

The β -citral substance in this study was found in the percentage of 35.71% among the other substances present in *Cymbopogon citratus* oil. Study by Silva et al. [30] demonstrated the significant antifungal activity of citral *in vitro* against *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* and *C. tropicalis*. Zore et al. [31] also revealed that citral was one of the most effective against *C. albicans* isolates, leading us to suppose that the antibiofilm action of *Cymbopogon citratus* oil may be related to this compound.

The presence of aldehydes (phenolic compound) in the extract, which are known for their antibacterial and fungitoxic activities [23, 32], may explain the results observed in this study.

Given the high adherence and biofilm formation by *Candida albicans* in medical devices and the antifungal resistance related to biofilm formation documented in the literature, the search for natural products that possess activity on this cellular structure so harmful to public health is relevant. Therefore, this research contributed to highlight the activity of *Cymbopogon citratus* in the inhibition of biofilm formation and removal of biofilm formed in the abiotic surfaces studied, and may be a possible natural product used alone or in conjunction with some antifungal, potentiating the effect, possibly being used to prevent and remove *C. albicans* biofilms on abiotic surfaces.

CONCLUSION

Candida albicans colonized the urinary probe, central venous catheter and needle fragments, forming 24-hour biofilms of low intensity in the needle, moderate in urinary tube and central venous catheter; 48-hour biofilms with strong intensity in all three medical-hospital materials. Demonstrating that this species has strong affinity for all these materials studied. The oil and extract of *C. citratus* showed antibiofilm activity against *C. albicans*, and in the central venous catheter the oil showed a better antibiofilm activity compared to the extract. *C. citratus* extract showed removal activity of *C. albicans* biofilms from abiotic surfaces.

Further studies regarding the action of *C. citratus*' oil and extract on *C. albicans* biofilms are needed, as we focus only on their *in vitro* activities.

Financial & competing interest's disclosure

Funding was provided from the Foundation for Scientific Research and Technological Development of the State of Maranhão (FAPEMA) (Notice 031/2016). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed. No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

REFERENCES

1. Costa G, Ferreira JP, Vitorino C *et al.* Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*. 178, 222–228 (2016).
2. Silva FS, Ferreira TM, Teodoro GR *et al.* Antifungal activity of *Cymbopogon citratus* essential oil on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains isolated from nosocomial infections. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 68(3), 434-41 (2009).
3. Venzon L, Mariano LNB, Somensi LB *et al.* Essential oil of *Cymbopogon citratus* (lemongrass) and geraniol, but not citral, promote gastric healing activity in mice. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 98, 118–124 (2018).
4. Córdoba S, Vivot W, Szusz W *et al.* Antifungal activity of essential oils against *Candida* species isolated from clinical samples. *Mycopathologia* (2019).
5. Fox EP, Bui CK, Nett JE *et al.* An expanded regulatory network temporally controls *Candida albicans* biofilm formation. *Mol. Microbiol.* 96(6), 1226–1239 (2015).
6. Sudbery PE. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol.*, 9(10):737-48 (2011).
7. Hsu C-C, Lai W-L, Chuang K-C *et al.* The inhibitory activity of linalool against the filamentous growth and biofilm formation in *Candida albicans*. *Med. Mycol.* 51, 473–482 (2013).
8. Nobile CJ, Johnson AD. *Candida albicans* biofilms and human disease. *Annu Rev Microbiol*, 69, 71-92 (2015).

9. Vipulanandan G, Herrera M, Wiederhold NP et al. Dynamics of Mixed-*Candida* Species Biofilms in Response to Antifungals. *Journal of Dental Research*, 97(1), 91-98 (2018).
10. Touil HFZ, Boucherit-otmani Z, Boucherit K. In vitro activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in intensive care department. *J Mycol Med*, 28(3), 414-418 (2018).
11. Ramage G, Rajendran R, Sherry L et al. Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*, 1-14 (2012).
12. Tsui C, Kong EF, Jabra-Rizk MA. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, 74(4) (2016).
13. Lohse MB, Gulati M, Valle A et al. Assessment and optimizations of *Candida albicans* in vitro biofilm assays. *Antimicrobial agents and Chemotherapy*, 61(5) (2017).
14. Silva-Dias A, Miranda IM, Branco J et al. Adhesion, biofilm formation, cell surface hydrophobicity, and antifungal planktonic susceptibility: relationship among *Candida* spp. *Frontiers in Microbiology*, 6(205) (2015).
15. Sandai D, Tabana YM, Ouweini AE et al. Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. *Jundishapur J Microbiol*, 9(11) (2016).
16. RAMOS ETA, BORGES KCAS, TEBALDI VMR. Atividade bactericida dos extratos hidroalcoólicos de hera-roxa e capim-limão e dos óleos essenciais de orégano, tomilho e melaleuca sobre *xanthomonas albilineans*. *Cadernos Unifoa*, 7(19) (2012).
17. Waterhouse AL. Polyphenols: determination of total phenolics. *Current protocols in food analytical chemistry*. New York: J. Wiley (2002).
18. Borges KRA, Rodrigues IVP, Pereira LA et al. *Euterpe oleracea* Mart. Inhibits virulence factors of *Aspergillus fumigatus*. *Future microbiol*. 14(8) (2019).
19. Ramage G, Rajendran R, Gutierrez-Correa M et al. *Aspergillus* biofilms: clinical and industrial significance. *FEMS Microbiol. Lett.* 324(2), 89–97 (2011).
20. Silva S, Negri M, Henriques M et al. Silicone colonization by non-*Candida albicans* *Candida* species in the presence of urine, *Journal of Medical Microbiology*, 59, 747–754 (2010).
21. Manoharan RK, Lee J-H, Lee J. Antibiofilm and Antihyphal Activities of Cedar Leaf Essential Oil, Camphor, and Fenchone Derivatives against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, 8(1476) (2017) doi:10.3389/fmicb.2017.01476
22. Ekpenyong CE, Akpan E, Nyoh, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 13(5), 321-337 (2015).
23. Khan MSA, Ahmad I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*, 140, 416-423 (2012).

24. Taweechaisupapong S, Aieamsaard J, Chitropas P *et al.* Inhibitory effect of lemongrass oil and its major constituents on *Candida* biofilm and germ tube formation. *South African Journal of Botany*, 81, 95-102 (2012).
25. Tyagi, AK, Malik, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of cymbopogon citratus. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 10(1) (2010).
26. Madeira PLB, Carvalho LT, Paschoal MAB *et al.* In vitro Effects of Lemongrass Extract on *Candida albicans* Biofilms, Human Cells Viability, and Denture Surface. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6(71) (2016).
27. Amornvit P, Choonharuangdej S, Srithavaj T. Lemongrass incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* culture. *J.Clin.Diagn. Res.* 8(7), 50–52 (2014).
28. Tadtong S, Watthanachaiyingcharoen R, Kamkaen N. (2014). Antimicrobial constituents and synergism effect of the essential oils from *Cymbopogon citratus* and *Alpinia galanga*. *Nat. Prod. Commun.* 9, 277–280 (2014).
29. Korenblum E, Goulart FRV, Rodrigues IA *et al.* Antimicrobial action and anticorrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. *AMB Exp.* 3(44) (2013).
30. Silva CDB, Guterres SS, Weisheimer V *et al.* Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against *Candida* spp. *Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 12(1), 63–66, (2008).
31. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S *et al.* Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle, *Phytomedicine*, 18(13), 1181–1190, (2011).
32. Machado M, Pires P, Dinis AM *et al.* Monoterpenic aldehydes as potential anti-Leishmania agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. *Exp. Parasitol.* 130, 223–231, (2012).

CONCLUSÃO

Candida albicans colonizou os fragmentos de sonda urinária, cateter venoso central e agulha, formando biofilmes de 24 hs de intensidade fraca na agulha e moderada em sonda urinária e cateter venoso central; biofilmes de 48 hs com intensidade forte em todos os três materiais médicos-hospitalares. Demonstrando que esta espécie tem forte afinidade por todos esses materiais estudados.

O extrato e óleo de *Cymbopogon citratus* foram produzidos a partir do *C. citratus* in natura obtido do Herbário da Universidade Federal do Maranhão.

O óleo e extrato de *C. citratus* apresentaram atividade antibiofilme contra *C. albicans*, sendo que no cateter venoso central o óleo apresentou a melhor atividade antibiofilme comparado ao extrato.

O extrato de *C. citratus* apresentou atividade removedora de biofilmes de *C. albicans* de superfícies abióticas.

É necessário fazer mais estudos sobre a ação do óleo e extrato de *C. citratus* em biofilmes de *Candida albicans*, pois neste trabalho abordamos apenas a suas atividades *in vitro*.

REFERÊNCIAS

ADAWSARI, H. M.; BADR-ELDIN, S. M.; LABIB, G. S. et al. Design and formulation of a topical hydrogel integrating lemongrass-loaded nanosponges with an enhanced antifungal effect: in vitro/ in vivo evaluation. *Intern Journ of Nanomedicine*, v. 10, p. 893-902, 2015.

AMORNVIT, P.; CHOONHARUANGDEJ, S.; SRITHAVAJ, T. Lemongrass incorporated tissue conditioner against *Candida albicans* culture. *J.Clin.Diagn. Res.*, v.8, n.7, p. 50–52, 2014.

CAMPOY, S., ADRIO, J. L. Antifungals. *Biochemical Pharmacology*, v.133, p. 86–96, 2017.

CASTILLO, G. D. V.; AZCURRA, A. I.; SOTOMAYOR, C. E. Lipasas de especies *Candida*: una revisión sobre aspectos bioquímicos, moleculares y patogénicos. *Revista de La Facultad de Ciencias Médicas de Córdoba*, v. 76, n. 2, 2019.

CHANDRA, J.; MUKHERJEE, P. K.; GHANNOUM, M. A. *Candida* biofilms associated with CVC and medical devices. *Mycoses*, v. 55, p. 46–57, 2012.

CHANDRA J.; MUKHERJEE P. K. *Candida* Biofilms: Development, Architecture, and Resistance. *Microbiology Spectrum.*, v. 3, n. 4, 2015.

CHUDZIK, B. *et al.* A new look at the antibiotic amphotericin B effect on *C. albicans* plasma membrane permeability and cell viability functions. *Eur Biophys J*, v. 44, p. 77-90, 2015.

CLEVELAND, A. A.; HARRISON, L. H.; FARLEY, M. M. *et al.* Declining incidence of candidemia and the shifting epidemiology of *Candida* resistance in two US metropolitan areas, 2008–2013: results from population based surveillance. *PLoS One*, v. 10, n. 3, 2015.

COSTA-ORLANDI, C. B. *et al.* *In vitro* characterization of *Trichophyton rubrum* and *T. mentagrophytes* biofilms. *Biofouling*, v. 30, n. 6, p. 719-727, 2014.

COSTA, G.; FERREIRA, J. P.; VITORINO C. *et al.* Polyphenols from *Cymbopogon citratus* leaves as topical anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 178, p. 222–228, 2016.

DESAI, J. V.; MITCHELL, A. P. *Candida albicans* biofilm development and its genetic control. *Microbiol Spectr*, v. 3, n. 3, 2016.

EKPENYONG, C. E.; AKPAN, E.; NYOH, A. Ethnopharmacology, phytochemistry, and biological activities of *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf extracts. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v. 13, n. 5, p. 321-337, 2015.

Fuller, J. *et al.* Species distribution and antifungal susceptibility of invasive *Candida* isolates from Canadian hospitals: results of the CANWARD 2011–16 study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.74, n. 4, p. 48-54, 2019.

GIONGO, J. L.; DE ALMEIDA V. R.; FAUSTO, V. P. *et al.* Anti- *Candida* activity assessment of *Pelargonium graveolens* oil free and nanoemulsion in biofilm formation in hospital medical supplies. *Microbial Pathogenesis*, v. 100, p. 170-178, 2016.

GRISHIN, A.V.; KARYAGINA, A.S. Polysaccharide Galactan Inhibits *Pseudomonas aeruginosa* Biofilm Formation but Protects Pre-formed Biofilms from Antibiotics. *Biochemistry Moscow*, v. 84, n. 5, p. 509-519, 2019.

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

HAQUE, F.; ALFATAH, M.; GANESAN, K *et al.* Inhibitory effect of sophorolipid on *Candida albicans* biofilm formation and hyphal growth. *Scientific reports*, v. 6, n.1, 2016.

JESUS, S. P. de. ***Candida e biofilmes orais: impacto e terapêutica.*** 2016. 72 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz, Portugal.

KAOMONGKOLGIT, R.; JAMDEE, K. Inhibitory effect of alpha-mangostin on *Candida* biofilms. *Odontology*, v. 105, n. 2, p. 248-253, 2017.

KORENBLUM, E.; GOULART, F. R. V.; RODRIGUES, I. A *et al.* Antimicrobial action and anticorrosion effect against sulfate reducing bacteria by lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil and its major component, the citral. *AMB Exp.*, v. 3, n. 44, 2013.

KHAN, M. S. A; AHMAD, I. Biofilm inhibition by *Cymbopogon citratus* and *Syzygium aromaticum* essential oils in the strains of *Candida albicans*. *J Ethnopharmacol*, v. 140, p. 416-423, 2012.

KRETZER, S. L. **Infecções relacionadas à assistência à saúde em hospital universitário de Santa Catarina: perfil epidemiológico de candidemia no período de janeiro de 2009 a dezembro de 2013.** 2015. 120 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

LEE, J.-H.; KIM, Y.-G.; LEE, J. Inhibition of *Candida albicans* biofilm and hyphae formation by biocompatible oligomers. *Letters in Applied Microbiology*, v. 67, n. 2, p. 123–129, 2018.

MADEIRA, P.L.B. **Efeito *in vitro* do extrato de capim-limão em biofilmes de *Candida albicans*, na viabilidade de células sanguíneas humanas e sobre a resina acrílica.** 2015. 53 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Centro Universitário do Maranhão, São Luís.

MANOHARAN, R. K; LEE, J. H; LEE, J. Antibiofilm and antihyphal activities of cedar leaf essential oil, camphor, and fenchone derivatives against *Candida albicans*. *Frontiers in Microbiology*, v. 8, n. 1476, 2017.

MARESCA, B.; CASTELLANO, S.; FORTINO, V. *et al.* *Microbiologia Molecolare e Cellulare*. Milano: McGraw-Hill, 2013.

MISHRA, N. N.; PRASAD, T.; SHARMA, N. *et al.* Pathogenicity and drug resistance in *Candida albicans* and other yeast species. A review. *Acta Microbiol. Immunol. Hung.* v. 54, n. 3, p. 201-235, 2007.

MOGAVERO, S.; TAVANTI, A.; SENESI, S. *et al.* Differential Requirement of the Transcription Factor Mcm1 for Activation of the *Candida albicans* Multidrug Efflux Pump MDR1 by Its Regulators Mrr1 and Cap1. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 55, n. 5, p. 2061–2066, 2011.

NETT, J.; ANDES, D. *Candida albicans* biofilm development, modeling a hostpathogen interaction. *Curr Opin Microbiol*, v. 9, p. 340-345, 2006.

NOBILE, C.J.; JOHNSON, A.D. *Candida albicans* Biofilms and Human Disease. *Annu Rev Microbiol*, v.69, p.71-92, 2015.

NUCCI, M.; QUEIROZ-TELLES, F.; ALVARADO-MATUTE, T. *et al.* Epidemiology of Candidemia in Latin America: A Laboratory- Based Survey. *PLos One*, v.8, n.3, 2013.

PINHATI, H.M.S. **Surto de candidemia por *Candida parapsilosis* resistente ao fluconazol, em um hospital em Brasília: caracterização clínica, molecular e avaliação dos fatores associados.** 2015. 107 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, Brasília.

PURISCO, S. U. **Prevalência e sensibilidade a antifúngicos de espécies de *Candida* pouco frequentes como agentes de candidemia.** 2010. 100 f. Dissertação – (Mestrado em Ciências) - Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, São Paulo.

RAMAGE, G.; RAJENDRAN, R.; SHERRY, L. *et al.* Fungal biofilm resistance. *Int J Microbiol*, p.1-14, 2012.

SANDAI, D.; TABANA, Y. M.; OUWEINI, A.E. *et al.* Resistance of *Candida albicans* Biofilms to Drugs and the Host Immune System. *Jundishapur J Microbiol*, v. 9, n. 11, 2016.

SANGLARD, D. Emerging Threats in Antifungal-Resistant Fungal Pathogens. *Frontiers in Medicine*, v. 3, n. 11, 2016.

SARDI, J. C.; ALMEIDA, A. M.; MENDES GIANNINI, M. J. New antimicrobial therapies used against fungi present in subgingival sites – a brief review. *Arch. Oral Biol*, v. 56, n. 10, p. 951-959, 2011.

SILVA, F. S.; FERREIRA, T. M.; TEODORO, G. R. *et al.* Atividade antifúngica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* frente a cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de infecções nosocomiais. *Ver Inst Adolfo Lutz*, v.68, n.3, p.434-41, 2009.

SEABRA, C. L. **Estudo de fatores de virulência de culturas mistas de *Candida albicans* e *Candida parapsilosis* após adesão a uma superfície abiótica.** 2011. 97 f. Dissertação (Mestrado Integrado em Engenharia Biomédica)- Universidade do Minho Escola de Engenharia, Portugal.

SUDBERY, P.E. Growth of *Candida albicans* hyphae. *Nat Rev Microbiol.*, v. 9, n. 10, p. 737-48, 2011.

TOBUDIC, S.; KRATZER, C.; PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. -Emerging pathogens? *Mycoses*, v. 55, n. 1, p. 24-32, 2012.

THOMPSON D. S.; CARLISLE P. L.; KADOSH D. Coevolution of morphology and virulence in *Candida* species. *Eukaryot Cell*. v. 10, n. 9, p. 1173-1182, 2011.

TOUIL, H. F. Z., BOUCHERIT-OTMANI, Z., BOUCHERIT, K. In vitro activity of antifungal combinations against planktonic and sessile cells of *Candida albicans* isolated from medical devices in intensive care department. *J Mycol Med*, v. 28, n. 3, 2018.

TSUI, C; KONG, E.F.; JABRA-RIZK, M.A. Pathogenesis of *Candida albicans* biofilm. *Pathogens and Disease*, v.74, n.4, 2016.

VANDEPUTTE, P., FERRARI, S., COSTE, A. T. Antifungal resistance and new strategies to control fungal infections, p. 1-26, 2012.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S.; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 44, n. 4, p. 457-472, 2014.

VIPULANANDAN, G.; HERRERA, M.; WIEDERHOLD N. P. *et al.* Dynamics of Mixed-*Candida* Species Biofilms in Response to Antifungals. *Journal of Dental Research*, v. 97, n. 1, 2018.

WALL, G.; MONTELONGO-JAUREGUI, D.; VIDAL, B. B. *et al.* Candida albicans biofilm growth and dispersal: contributions to pathogenesis. *Current opinion in microbiology*, v. 52, p. 1-6, 2019.

WHALEY, S. G. *et al.* Azole antifungal resistance in Candida albicans and emerging non-albicans Candida Species. *Frontiers in Microbiology*, v. 7, n. JAN, p. 1–12, 2017.

WILLIAMS, D.W. *et al.* Candida biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000*, v. 55, p. 250–265, 2011.

ZAREI, M.A.; ZARRIN, M.; KIASAT, N. Biofilm formation and susceptibility to amphotericin B and fluconazole in *Candida albicans*. *Jundishapur J Microbiol*, v.7, n.7, 2014.

ZIDA, A.; BAMBA, S.; YACOUBA, A. *et al.* Anti- *Candida albicans* natural products, sources of new antifungal drugs: A review. *Journal de Mycologie Médicale*, v. 27, n. 1, p. 1–19, 2016.

ZUCCHI, M. R. *et al.* Levantamento etnobotânico de plantas medicinais na cidade de Ipameri – GO. *Rev Bras Pl Med*, v. 15, n. 2, p. 273-279, 2013.

ANEXOS

