

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA E
MUTAGÊNICA DO GERANIOL CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA* spp.
ISOLADAS DE PACIENTES COM ESTOMATITE PROTÉTICA: UMA ANÁLISE
*IN SÍLICO E IN VITRO***

JOSÉ KLIDENBERG DE OLIVEIRA JÚNIOR

2024

SAPIENTIA AEDIFICAT

JOSÉ KLIDENBERG DE OLIVEIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA E
MUTAGÊNICA DO GERANIOL CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA* spp.
ISOLADAS DE PACIENTES COM ESTOMATITE PROTÉTICA: UMA ANÁLISE
*IN SÍLICO E IN VITRO***

**EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL, CYTOTOXIC AND
MUTAGENIC ACTIVITIES OF GERANIOL AGAINST *CANDIDA* spp.
SPECIES ISOLATED FROM A PATIENT WITH PROSTHETIC
STOMATITIS: AN *IN SILICO* AND *IN VITRO* ANALYSIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Odontologia – Área de Concentração Ciências Odontológicas.

Orientadora: Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Lima

João Pessoa

2024

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA SETORIAL DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
BIBLIOTECÁRIO:

O48a Oliveira Júnior, José Klidenberg de. Avaliação das atividades antifúngica, citotóxica e mutagênica do geraniol contra espécies de <i>Candida</i> spp. isoladas de pacientes com estomatite protética : uma análise in silico e in vitro / José Klidenberg de Oliveira Júnior. - João Pessoa, 2024. 88 f. : il. Orientação: Edeltrudes de Oliveira Lima. Tese (Doutorado) - UFPB/CCS. 1. Geraniol. 2. Produtos biológicos. 3. Atividade antifúngica. I. Lima, Edeltrudes de Oliveira. II. Título. UFPB/BC CDU 616.314:547.9 (043)
--

Elaborado por CHRISTIANE CASTRO LIMA DA SILVA - CRB-15/865

Informações Complementares:

Título em outro idioma: **EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL, CYTOTOXIC AND MUTAGENIC ACTIVITIES OF GERANIOL AGAINST *CANDIDA* spp. SPECIES ISOLATED FROM A PATIENT WITH PROSTHETIC STOMATITIS: AN *IN SILICO* AND *IN VITRO* ANALYSIS**

Palavras-chave em outro idioma: Geraniol; *Candida*; Terpenes; Biological Products; Antifungal Activity; Antifungal Combination; Denture Stomatitis.

Área de concentração: Ciências Odontológicas

Linha de Pesquisa: Inovações dos Produtos e Terapêuticas dos Agravos em Saúde

1. Banca examinadora: Edeltrudes de Oliveira Lima PPGO/UFPB; André Ulisses Dantas Batista UFPB/PPGO; Adriano Francisco Alves UFPB/PPGO; Abrahão Alves de Oliveira Filho UFCG/PPGDITM-UFPB; Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes PGBCM/UFPB. Data da defesa: 30/08/2024

Informações acadêmicas e profissionais do(a) aluno(a)

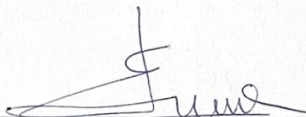
- ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4539-2007>

- Link do Currículo Lattes: <http://lattes.cnpq.br/3277389205255240>

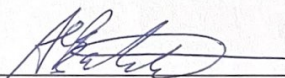
JOSÉ KLIDENBERG DE OLIVEIRA JÚNIOR

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA E
MUTAGÊNICA DO GERANIOL CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA* spp.
ISOLADAS DE PACIENTES COM ESTOMATITE PROTÉTICA: UMA
ANÁLISE *IN SÍLICO* E *IN VITRO***

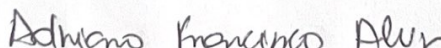
A comissão examinadora abaixo relacionada julgou a Defesa de Tese apresentada em sessão pública no dia 30 de agosto de 2024 e atribuiu o conceito APROVADO(A)



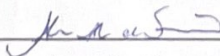
Prof. Dra. Edeltrudes de Oliveira Júnior
Orientador - UFPB



Prof. Dr. André Ulisses Dantas Batista
Examinador - UFPB



Prof. Dr. Adriano Francisco Alves
Examinador – UFPB



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho
Examinador - UFCG



Prof. Dr. Luiz Eduardo Marinho Vieira
Examinador – UEPB

OLIVEIRA-JÚNIOR, J.K. AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIFÚNGICA, CITOTÓXICA E MUTAGÊNICA DO GERANIOL CONTRA ESPÉCIES DE *CANDIDA* spp. ISOLADAS DE PACIENTES COM ESTOMATITE PROTÉTICA: UMA ANÁLISE *IN SÍLICO* E *IN VITRO*. 89p. Tese (Pós-Graduação em Odontologia). Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2024.

RESUMO

Introdução: A estomatite protética é uma condição inflamatória comum em usuários de próteses dentárias, frequentemente associada à infecção por espécies de *Candida* multirresistentes. O geraniol, um monoterpene encontrado em óleos essenciais de várias plantas, tem demonstrado propriedades antifúngicas promissoras para o tratamento dessas doenças. **Objetivo:** Avaliar as atividades antifúngica do geraniol contra espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, investigar seus mecanismos de ação, realizar ensaios de associação com nistatina e miconazol, além de avaliar a citotoxicidade em células sanguíneas, a mutagenicidade e conduzir estudos *in silico* por meio do docking molecular.

Metodologia: A atividade antifúngica do geraniol foi avaliada por meio de ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme recomendado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Ensaios de sorbitol e ergosterol foram realizados para entender os mecanismos de ação do geraniol. Nos ensaios com sorbitol, avaliou-se a alteração na CIM em presença de 0,8 M de sorbitol. Nos ensaios com ergosterol, a CIM foi determinada na presença de 400 µg/mL de ergosterol exógeno. Estudos de associação com nistatina e miconazol foram conduzidos utilizando a técnica de *checkerboard* para determinar os Índices de Concentração Inibitória Fracionada (ICIF). A citotoxicidade foi avaliada em eritrócitos humanos de diferentes tipos sanguíneos (A, B, O) por meio de ensaios de hemólise, enquanto a mutagenicidade foi investigada em células epiteliais da mucosa oral utilizando análise de micronúcleos e outros marcadores genotóxicos. O docking molecular foi realizado para prever as interações entre o geraniol e proteínas-chave das células fúngicas, bem como sua interação com o ergosterol.

Resultados: O geraniol apresentou de CIMs de 64 µg/mL para *C. albicans* e 32-64 µg/mL para *C. tropicalis*, valores comparáveis aos antifúngicos padrões, nistatina e miconazol. A atividade fungicida do geraniol foi confirmada pelas CFM, com valores

de 128 µg/mL para *C. albicans* e 64-128 µg/mL para *C. tropicalis*. A proporção CFM/CIM de 1:1 ou 2:1 confirma a ação fungicida do geraniol. Nos ensaios com sorbitol, a CIM do geraniol aumentou de 64 µg/mL para 256 µg/mL contra *C. albicans*, indicando que ele desestabiliza a integridade da parede celular fúngica. Para *C. tropicalis*, não houve variação na CIM na presença de sorbitol. Nos ensaios com ergosterol, a CIM do geraniol aumentou significativamente na presença de ergosterol exógeno, variando de 64 µg/mL para 256 µg/mL tanto para *C. albicans* quanto para *C. tropicalis*, indicando que o geraniol interage diretamente com o ergosterol na membrana plasmática dos fungos. A associação entre geraniol e nistatina mostrou predominantemente efeitos de indiferença, exceto na cepa clínica LM-4B, onde houve efeito aditivo (ICIF = 0.625). A combinação de geraniol e miconazol demonstrou sinergismo significativo na cepa LM-4B (ICIF = 0.25). Os ensaios de citotoxicidade revelaram que, em baixas concentrações, o geraniol não causou hemólise significativa, enquanto em concentrações elevadas (500-1000 µg/mL) a hemólise superou 80%. A análise de mutagenicidade mostrou que o geraniol induziu alterações celulares apenas em altas concentrações, e o docking molecular confirmou as interações do geraniol com proteínas-chave das células fúngicas, sugerindo mecanismos de ação que contribuem para sua eficácia antifúngica. **Conclusão:** O geraniol destaca-se como uma promissora alternativa terapêutica para o tratamento de infecções fúngicas bucais, oferecendo uma solução eficaz e segura, especialmente na gestão da estomatite protética. No entanto, o uso de concentrações mais elevadas deve ser abordado com cautela devido ao risco de citotoxicidade e mutagenicidade. Estudos adicionais são necessários para definir parâmetros seguros e explorar aplicações clínicas mais amplas, impulsionando novas fronteiras na pesquisa em produtos e terapêuticas odontológicas.

Palavras-chave: Geraniol; *Candida*; Terpenos; Produtos Biológicos; Atividade Antifúngica; Associação de Antifúngicos; Estomatite sob Prótese.

OLIVEIRA-JÚNIOR, J.K. EVALUATION OF THE ANTIFUNGAL, CYTOTOXIC AND MUTAGENIC ACTIVITIES OF GERANIOL AGAINST CANDIDA SPP SPECIES. ISOLATED FROM PATIENTS WITH PROSTHETIC STOMATITIS: AN IN SILICO AND IN VITRO ANALYSIS. 89p. Thesis (Postgraduate in Dentistry). Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2024.

ABSTRACT

Introduction: Denture stomatitis is a common inflammatory disease in denture wearers that is often associated with infections caused by multidrug-resistant *Candida* species. Geraniol, a monoterpene found in essential oils of various plants, has shown promising antifungal properties for treating such conditions. **Objective:** To evaluate the antifungal activities of geraniol against *Candida albicans* and *Candida Tropicalis* species, to study its mechanisms of action, to carry out combination tests with nystatin and miconazole, and to evaluate its cytotoxicity in blood cells, mutagenicity and to carry out in silico studies by molecular docking. **Methods:** The antifungal activity of geraniol was evaluated by minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) tests using the broth microdilution method as recommended by the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Sorbitol and ergosterol tests were performed to understand the mechanisms of action of geraniol. In the sorbitol assays, the change in MIC was evaluated in the presence of 0.8 M sorbitol. In the ergosterol tests, the MIC was determined in the presence of 400 µg/ml exogenous ergosterol. To determine fractional inhibitory concentration indices (FICI), combination studies with nystatin and miconazole were performed using the checkerboard method. Cytotoxicity was assessed in human erythrocytes of different blood groups (A, B, O) by hemolysis assays, while mutagenicity was examined in oral mucosal epithelial cells using micronucleus analysis and other genotoxic markers. Molecular docking was performed to predict the interactions between geraniol and key fungal cell proteins as well as its interaction with ergosterol. **Results:** Geraniol showed MIC values of 64 µg/ml for *C. albicans* and 32-64 µg/ml for *C. tropicalis*, comparable to the standard antifungals nystatin and miconazole. The fungicidal activity of geraniol was confirmed by MFCs with values of 128 µg/ml for *C. albicans* and 64-128 µg/ml for *C. tropicalis*. The MFC/MIC ratio of 1:1 or 2:1 confirms the fungicidal effect of geraniol. In the sorbitol tests, the MIC of geraniol against *C. albicans* increased from

64 µg/ml to 256 µg/ml, indicating that it disrupts the integrity of fungal cell walls. No change in MIC was observed in *C. tropicalis* in the presence of sorbitol. In the ergosterol assays, the MIC of geraniol increased significantly in the presence of exogenous ergosterol and ranged from 64 µg/ml to 256 µg/ml in both *C. albicans* and *C. tropicalis*, suggesting that geraniol interacts directly with ergosterol in fungal plasma membranes. The combination of geraniol and nystatin showed predominantly indifferent effects, with the exception of the clinical strain LM-4B, in which an additive effect was observed (FICI = 0.625). The combination of geraniol and miconazole showed significant synergy in strain LM-4B (FICI = 0.25). Cytotoxicity tests revealed that geraniol did not cause significant hemolysis at low concentrations, while at higher concentrations (500–1000 µg/ml), hemolysis exceeded 80%. Mutagenicity analysis showed that geraniol caused cellular changes only at high concentrations, and molecular docking confirmed geraniol's interactions with key fungal cell proteins, suggesting mechanisms of action contributing to its antifungal efficacy. **Conclusion:** Geraniol proves to be a promising therapeutic alternative for the treatment of oral fungal infections and offers an effective and safe solution, especially in the treatment of denture stomatitis. However, use of higher concentrations should be done with caution due to the risk of cytotoxicity and mutagenicity. Further studies are required to define safe parameters and explore broader clinical applications, opening up new frontiers in dental product and therapy research.

Keywords: Geraniol; *Candida*; Terpenes; Biological Products; Antifungal Activity; Antifungal Combination; Denture Stomatitis.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos que, com amor e sabedoria, inspiraram e apoiaram cada etapa desta jornada. Que ele seja um tributo à busca constante pelo conhecimento e ao valor das relações que enriquecem nossa vida

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela dádiva da vida, por proporcionar saúde e paz, e por me conceder uma vida repleta de felicidade com a oportunidade de realizar muitos dos meus sonhos.

À minha orientadora, Profa. Edeltrudes de Oliveira Lima, agradeço profundamente pela sua sabedoria, competência e simplicidade. Sua orientação objetiva, eficaz e carinhosa foi essencial para o desenvolvimento desta pesquisa. Sou especialmente grato pela confiança que, desde o início, depositou em mim, fazendo toda a diferença no meu desempenho. MUITO OBRIGADO!!

A minha mãe Irene, que nunca mediu esforços para me ajudar durante toda minha formação. Serei eternamente grato pelo apoio ilimitado e amor incondicional. Obrigado por todos os anos de dedicação, você é fundamental na minha vida.

As minhas irmãs Yarla e Yarlina, pela simples existência de vocês ao meu lado! Amo vocês!!

Aos meus queridos sobrinhos, que com suas risadas e alegria iluminam meus dias. Vocês são a prova viva de que o amor puro e a felicidade simples são os maiores presentes que a vida pode nos dar. Obrigado por encherem meu coração de amor e me lembrarem todos os dias do que realmente importa

À Universidade Federal da Paraíba, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, minha gratidão pela oportunidade de realizar o doutorado.

A todos os Professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFPB, cuja dedicação à docência é uma fonte de inspiração para todos nós.

A Gustavo, que me acompanha com carinho e apoio incondicional, tornando cada momento mais especial. Sua presença é uma bênção em minha vida, e sou eternamente grato por tudo que compartilhamos.

Aos amigos que a vida me presenteou — Mariana Xerez, Luiz Eduardo, Marisley Layrtha, Manoela Natacha, Gabriella Nóbrega e Vinícius Sampaio — vocês são mais especiais do que as palavras podem expressar. Cada um de vocês tem um lugar cativo no meu coração

Ao meu amigo-irmão Luan Éverton, pelo incentivo e está presente nas adversidades e alegria, saiba que tenho uma forte admiração pelo ser humano e profissional que és. Somos irmãos de maternidades diferentes.

Agradeço a Nayana Rocha, que contribuiu de forma essencial na condução de parte dos experimentos desta pesquisa. Sua disponibilidade e compromisso foram inestimáveis para o sucesso deste trabalho.

Ao Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos, coordenado pelo professor Abrahão Alves de Oliveira Filho, e a Milena de Souza e Maria Alice, que auxiliaram na condução de parte dos ensaios desta pesquisa, meu sincero agradecimento pela valiosa colaboração e suporte.

Ao Centro Universitário Santa Maria, em especial aos professores do curso de Odontologia, e aos queridos amigos Alexandre, Raulison e Clarissa, minha profunda gratidão pelo apoio, amizade e dedicação ao longo desta jornada.

Às minhas amigas que o mestrado me presenteou, Rebeca Dantas e Priscilla Leite, agradeço pelos momentos de descontração e pelo apoio incondicional. Vocês ocupam um lugar especial no meu coração.

Aos membros da Banca Examinadora Profº André Ulisses e Prof. Abrahão Alves, Prof. Adriano Alves e Prof. Ulrich Vasconcelos pela presença e soma de conhecimentos direcionados ao trabalho. São pessoas que tenho forte admiração.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela dedicação ao desenvolvimento da pesquisa no Brasil.

EPÍGRAFE

O verdadeiro sinal de inteligência não é o conhecimento, mas a imaginação.

Albert Einstein

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASD Ágar Sabouraud extrose

ATCC American Type Culture Collection

CDR Candida Drug Resistance

CCS Centro de Ciências da Saúde

CFM Concentração Fungicida mínima

CIM Concentração inibitória mínima

DMSO Dimetilsulfóxido

EP Estomatite Protética

LM Laboratório de Micologia

MAPK Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos

MAPKK Quinases de Proteínas Quinases Ativadas por Mitógenos

MDR Multidrug Resistance

OMS Organização Mundial da Saúde

PKC Proteína Quinase C

RPMI Roswell Park Memorial Institute.

SUS Sistema Único de Saúde

UFC/mL Unidades formadoras de colônias por mililitro

UFPB Universidade Federal da Paraíba

Obs.: As abreviaturas, siglas e símbolos utilizados neste trabalho e que não constam nesta relação, encontram-se descritas no texto ou são convenções adotadas universalmente.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA POR <i>Candida</i> spp. – EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS	17
2.2 TERAPIA ANTIFÚNGICA	22
2.3 INOVAÇÕES DOS PRODUTOS E TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DOS AGRAVOS EM SAÚDE.....	28
3.1 OBJETIVOS	33
3.2 Objetivo geral	33
3.3 Objetivos específicos	33
4. ARTIGO 1: <i>Efficacy of Geraniol in Inhibiting Strains of Candida albicans and Candida tropicalis Isolated from Patients with Denture-Related Stomatitis</i>.....	34
5. ARTIGO 2: <i>Geraniol and Its Effects on Human Cells: A Study of Cytotoxicity and Genotoxicity</i>.....	57
6. CONSIDERAÇÕES GERAIS	71
8. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXO A: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO	84
ANEXO B: CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	86
ANEXO C: CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE.....	88

1. INTRODUÇÃO

A Estomatite Protética (EP) é uma inflamação nos tecidos bucais, comum entre usuários de próteses, sendo a infecção por *Candida* o principal fator causador (GENDREAU; LOEWY, 2011; IOSIF et al., 2016; YARBOROUGH et al., 2017; RAI et al., 2022). *C. albicans* é a mais frequentemente associada a essa condição. Além dela, outras espécies menos frequentes, como *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. krusei*, também podem estar presentes na microbiota bucal e tornar-se patogênicas (ZOMORODIAN et al., 2011; LEITE, PIVA, MARTINS-FILHO et al., 2015).

A etiologia da EP é multifatorial, embora a infecção por *Candida spp.* seja a causa mais comum. Por ser assintomática na maioria dos casos, muitos indivíduos não sabem que a possuem. O tratamento é necessário, pois a EP pode servir como um reservatório para infecções mais graves (SALERNO et al., 2011). Vale destacar que a estomatite protética associada a *Candida* é difícil de tratar e frequentemente recidiva (WEBB; THOMAS; WHITTLE, 2005)

As altas taxas de recidiva criam um cenário preocupante, e falhas na terapia antifúngica resultam em doenças prolongadas, maior toxicidade e até mesmo mortes. Para reverter essa situação, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incentiva mais pesquisas na área (BARROS et al., 2023)

Para o tratamento das candidíases, são utilizadas três principais classes químicas: azóis, polienos e equinocandinas (PEREIRA; PAIVA, 2010; MENEZES et al., 2013). Os azóis, como miconazol, fluconazol e itraconazol, inibem a enzima 14- α -desmetilase, bloqueando a produção de ergosterol e, consequentemente, inibindo o crescimento fúngico (CUENCA-ESTRELLA, 2010; FREIRE et al., 2017). Os polienos, como nistatina e anfotericina B, atuam diretamente no ergosterol, desestruturando a membrana celular, formando poros que aumentam a permeabilidade transmembranar, levando à ruptura e morte celular (CUENCA-ESTRELLA, 2010). As equinocandinas, incluindo micafungina, caspofungina e anidulafungina, inibem a enzima β -(1,3) -D-glucano sintase na parede celular, comprometendo sua estabilidade e causando lise e morte do fungo (CORTÉS; RUSSI, 2011; PIGATTO et al., 2009).

Diante do crescente aumento da resistência aos antifúngicos sintéticos e dos riscos associados à sua toxicidade, é imperativo incentivar pesquisas com substâncias naturais. Produtos naturais e seus derivados têm se destacado como fontes valiosas de compostos bioativos com propriedades antifúngicas, apresentando baixa toxicidade e custos reduzidos. Além disso, a síntese de substâncias sintéticas é dispendiosa, e a aprovação de novos compostos que superem as fases pré-clínicas e clínicas é um fenômeno raro (BARROS et al., 2023; QIU et al., 2023).

A utilização de produtos naturais como tratamento alternativo se difere por apresentar uma diversidade molecular superior aos sintéticos, proporcionando novas descobertas, com pesquisa das atividades biológicas que podem favorecer na prevenção e tratamento de doenças (SHARMA et al., 2016).

Dentre todos os produtos naturais, são reconhecidos que os monoterpenos, principais compostos dos óleos essenciais, ao estar presente em 90% da composição, compreendem um enorme potencial biológico, exposto por vários de seus representantes, o que inclui admirável ação antimicrobiana intrínseca (FRIEDMAN et al., 2004; BAKKALI, et al., 2008; KHAN;MALIK;AHMAD, et al., 2012; PINTEA et al., 2022; SINGH et al.,2018) e, interação benéfica com antimicrobianos ao ampliar o espectro de atividade desses agentes (HEMAISWARYA; DOBLE, 2009; ZORE et al., 2011).

O geraniol é um monoterpeno isoprenóide acíclico presente em óleos essenciais de várias plantas aromáticas, caracterizado por sua estrutura química flexível e acíclica que facilita a interação com diferentes alvos biológicos. Suas funções biológicas e farmacológicas são amplas, incluindo atividades antitumorais, anti-inflamatórias, antioxidantes, hepatoprotetoras, antidiabéticas e neuroprotetoras (KHAN et al., 2012; QUEIROZ et al., 2017; SINGULAN et al., 2018).

Neste contexto, a linha de pesquisa "Inovações dos Produtos e Terapêuticas dos Agravos em Saúde" desempenha um papel fundamental na evolução da Odontologia contemporânea, especialmente no desenvolvimento de produtos naturais com potencial terapêutico. A investigação da toxicidade de compostos naturais é essencial para garantir que, além de eficazes, esses produtos sejam seguros para uso clínico (QUEIROZ et al., 2017)

O geraniol, um monoterpeno encontrado em óleos essenciais de várias

plantas, tem sido amplamente estudado por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e anticâncer. No entanto, como qualquer outro composto natural com potencial terapêutico, é fundamental avaliar não apenas sua eficácia, mas também seus possíveis efeitos tóxicos, incluindo citotoxicidade e genotoxicidade. Essas avaliações são indispensáveis para assegurar que o uso desses produtos não represente riscos à saúde dos pacientes (SINGULANI et al., 2018)

A pesquisa em toxicidade de produtos naturais, como o geraniol, envolve o uso de diversas metodologias para avaliar sua interação com células humanas e microrganismos patogênicos. Técnicas como o docking molecular podem oferecer uma compreensão sobre a interação desses compostos com alvos biológicos específicos, enquanto estudos *in vitro* e *ex vivo* proporcionam uma compreensão mais profunda de seus efeitos citotóxicos e genotóxicos (QUEIROZ et al., 2017; BELL; ZHANG, 2017).

A exploração das propriedades de compostos naturais e a avaliação rigorosa de sua toxicidade contribuem para o desenvolvimento de novas terapias na Odontologia, alinhando-se com a missão de melhorar a qualidade de vida dos pacientes através de soluções terapêuticas seguras e inovadoras. Desta forma, a pesquisa sobre o geraniol e outros compostos naturais reflete um compromisso com a inovação e a segurança, buscando introduzir novas opções terapêuticas que atendam aos desafios odontológicos contemporâneos (QUEIROZ et al., 2017; BELL; ZHANG, 2017; BARROS et al., 2023; QIU et al., 2023).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTOMATITE PROTÉTICA POR *Candida* spp. – EPIDEMIOLOGIA, DIAGNÓSTICO E CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

A estomatite protética é uma condição inflamatória crônica que afeta a mucosa oral subjacente às próteses dentárias removíveis, sendo caracterizada por eritema, edema e, em casos graves, hiperplasia papilar inflamatória. Comumente associada à infecção por *Candida* spp., especialmente *Candida albicans*, a estomatite protética é influenciada por múltiplos fatores etiológicos, incluindo higiene inadequada da prótese, uso contínuo e noturno das próteses, acúmulo de biofilme na superfície protética e trauma mecânico devido a próteses mal ajustadas (PERIC et al., 2024).

Estudos epidemiológicos indicam que a prevalência da estomatite protética entre os usuários de próteses varia de 15% a mais de 70%, dependendo da população estudada e da metodologia utilizada. Estudos conduzidos nos Estados Unidos, por exemplo, relataram uma prevalência de 28% entre os usuários de próteses removíveis, com taxas mais altas entre usuários de próteses maxilares completas (35%) em comparação com próteses mandibulares (18%) (SHULMAN et al., 2005)

Estudos populacionais nacionais e regionais realizados na Dinamarca, Eslovênia, Espanha e Turquia relataram prevalência de estomatite protética entre usuários de próteses dentárias de 65%, 14,7%, 19,6% e 18,5%, respectivamente. (BUDTZ-JORGENSEN et al. 1975; MUMCU et al. 2005; VALLEJO et al. 2002).

A prevalência da estomatite protética tende a ser maior em idosos e mulheres. Na Finlândia, dois estudos nacionais relataram prevalências de 48% e 35%, respectivamente, entre usuários de próteses, com uma porcentagem maior de usuárias mulheres apresentando estomatite em comparação com homens. Esses achados são consistentes com estudos realizados na Eslovênia e no Chile, onde mulheres idosas apresentaram prevalência significativamente maior de estomatite protética em relação aos homens (GENDREAU; LOEWY, 2011).

A incidência da estomatite protética é influenciada por vários fatores, incluindo a higiene da prótese, o uso contínuo e noturno de próteses removíveis, a acumulação de placa na prótese e a contaminação bacteriana e fúngica da superfície da prótese (Figura 1). Próteses mal ajustadas que causam trauma à

mucosa também é um fator contribuinte. Todos esses fatores aumentam a capacidade da *Candida albicans* de colonizar tanto a prótese quanto as superfícies mucosas orais, onde atua como patógeno oportunista (GENDREAU; LOEWY, 2011).



Figura 1: Do autor **Fonte dos dados:** Baseados nos estudos de GENDREAU; LOEWY, 2011

Estudos indicam que a má higiene das próteses é um dos principais fatores de risco para a estomatite protética. Dentaduras mal higienizadas desenvolvem rapidamente biofilmes aderentes e acumulam placa patogênica, o que contribui para a inflamação oral. A remoção noturna das próteses, a limpeza adequada e a desinfecção regular são essenciais para prevenir o desenvolvimento e a recorrência da estomatite protética (FREIRE et al., 2017; AGUAYO et al., 2017 MCREYNOLDS et al., 2023).

Os fatores etiológicos da estomatite protética são múltiplos e podem ser classificados em microbiológicos, mecânicos, imunológicos, sistêmicos, nutricionais e comportamentais. *Candida albicans* é o principal agente etiológico, capaz de aderir à superfície da prótese e formar biofilmes resistentes a tratamentos convencionais (HANNAH et al., 2017).

Condições sistêmicas, como diabetes, imunossupressão e xerostomia (ressecamento bucal), podem predispor os pacientes à estomatite protética, diminuindo a resposta imunológica local e sistêmica (SALERNO et al., 2011). Dietas ricas em carboidratos, tabagismo e consumo de álcool são fatores nutricionais e comportamentais que podem contribuir para o desenvolvimento da estomatite

protética. A higiene oral inadequada é um dos principais fatores comportamentais que predis põem a esta condição (HANNAH et al., 2017).

O uso contínuo de próteses sem períodos adequados de descanso noturno impede a recuperação da mucosa e contribui para a irritação crônica e inflamação. A falta de limpeza regular da prótese permite a formação de biofilmes complexos, que protegem os microrganismos das ações de agentes antifúngicos e desinfetantes, complicando o tratamento (SHUI et al., 2020). A combinação desses fatores resulta em um ambiente favorável para a proliferação de *Candida* spp. e o desenvolvimento da estomatite protética, evidenciando a importância de uma abordagem multifatorial no manejo e prevenção dessa condição.

Além disso, outras espécies de *Candida*, como *Candida glabrata*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei* e *Candida parapsilosis*, também estão associadas ao desenvolvimento da estomatite protética (GENDREAU; LOEWY, 2011; SHUI et al., 2020). A má adaptação da prótese, associada ao uso prolongado sem remoção, pode causar trauma mecânico à mucosa, favorecendo a colonização por *Candida* spp. A presença de porosidades na superfície acrílica da prótese facilita a aderência microbiana (SALERNO et al., 2011).

Estudos recentes indicam que a *Candida tropicalis* é a segunda espécie mais comum de *Candida* encontrada em infecções orais, especialmente em pacientes imunocomprometidos e usuários de próteses dentárias. A prevalência de *C. tropicalis* varia de acordo com a região geográfica e a população estudada, mas sua presença é significativa, especialmente em regiões tropicais e subtropicais, onde as condições ambientais favorecem seu crescimento e colonização (ZOMORODIAN et al., 2011).

Estudar espécies tropicais como a *Candida tropicalis* é importante por várias razões. Primeiramente, *C. tropicalis* apresenta resistência a muitos antifúngicos convencionais, como fluconazol e itraconazol, tornando o tratamento mais desafiador e destacando a necessidade de novas abordagens terapêuticas (ZOMORODIAN et al., 2011; MARCOS-ARIAS et al., 2011).

Além disso, espécies tropicais de *Candida*, especialmente *C. tropicalis*, têm maior capacidade de formação de biofilmes e produção de enzimas hidrolíticas que degradam tecidos, contribuindo para a severidade das infecções orais. As diferentes respostas de tratamento entre as espécies de *Candida* são atribuídas à sua diversidade genética. Estudos genéticos dessas espécies podem fornecer

informações sobre mecanismos de resistência e virulência, além do potencial para desenvolver novos antifúngicos (BARS et al., 2022)

A infecção por *C. tropicalis* pode levar a quadros clínicos mais graves de estomatite protética, aumentando o desconforto e as complicações nos pacientes. Compreender sua epidemiologia é essencial para desenvolver estratégias de prevenção e tratamento mais eficazes. Em ecossistemas tropicais, a interação entre *Candida spp.* e outros microrganismos pode influenciar a dinâmica das infecções. Estudos dessas interações podem revelar novos alvos terapêuticos e maneiras de controlar a colonização de *Candida* em usuários de próteses (ZOMORODIAN et al., 2011; MARCOS-ARIAS et al., 2011; BARS et al., 2022).

O diagnóstico da estomatite protética é primariamente clínico, baseado nos sinais e sintomas observados na mucosa oral sob a prótese dentária. O dentista realiza uma inspeção visual da mucosa oral, procurando sinais de eritema, edema e, em casos graves, hiperplasia papilar inflamatória. A classificação de Newton (2003) é frequentemente usada para descrever a gravidade da estomatite protética, dividindo-a em:

Hiperemia Puntiforme (classe I): Hiperemia dos ductos das glândulas salivares palatinas menores, com aspecto eritematoso pontilhado, podendo afetar áreas dispersas ou pequenas regiões localizadas no palato (Figura 2B).

Hiperemia Difusa (classe II): Mucosa lisa e atrófica com aspecto eritematoso em toda a região sob a prótese (Figura 2C).

Hiperemia Granular (classe III): Frequentemente associada à câmara de sucção, afeta a região central do palato, apresentando uma aparência nodular e rugosa da mucosa (Figura 2D).

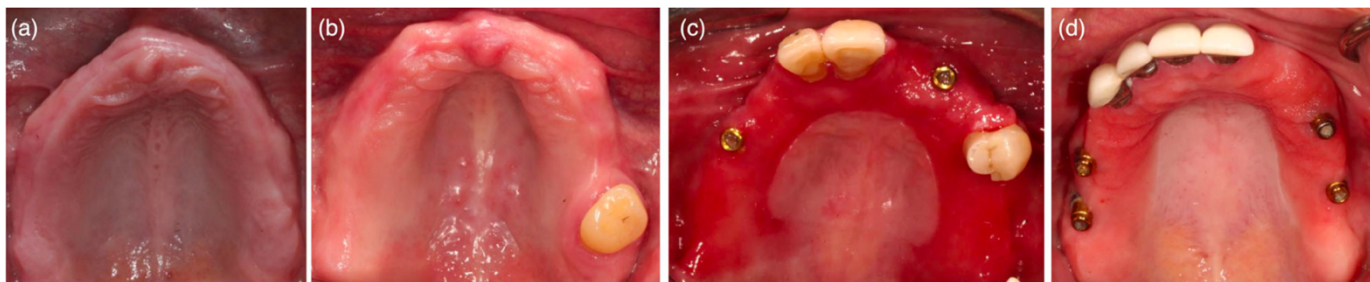


Figura 2: (A) mostra uma área saudável portadora de prótese dentária. (B) hiperemia puntiforme da Classe I de Newton, ou eritema pontilhado localizado na área posterior palatina portadora de dentadura. (C) hiperemia difusa da Classe II de Newton, com eritema mais disseminado por toda a área portadora de dentadura. (D) mostra hiperemia granular da Classe III de Newton, também conhecida como hiperplasia papilar. Disponível em: MCREYNOLDS et al., 2023.

Além da inspeção visual, a coleta de uma história clínica detalhada do paciente é essencial, incluindo a duração do uso da prótese, hábitos de higiene, uso noturno da prótese e qualquer desconforto ou dor relatada (PERIC et al., 2024). Exames microbiológicos são frequentemente utilizados para confirmar a presença de *Candida* spp. e outras espécies fúngicas. Amostras da mucosa oral ou da superfície da prótese podem ser cultivadas em meio específico, e testes de sensibilidade são realizados para determinar a susceptibilidade das espécies de *Candida* aos antifúngicos, orientando o tratamento (BARBOSA et al., 2019)

A citologia esfoliativa, onde amostras celulares da mucosa oral são coletadas e examinadas microscopicamente, pode detectar a presença de células inflamatórias e hifas de *Candida*. Em casos graves ou persistentes, uma biópsia da mucosa afetada pode ser realizada para um exame histopatológico mais detalhado, identificando características específicas de inflamação crônica e infecção fúngica (Yarborough et al., 2016)

O diagnóstico diferencial é importante para excluir outras condições que podem apresentar sintomas semelhantes, como quelite angular, líquen plano, reações alérgicas de contato e lesões traumáticas. Após o diagnóstico inicial, o monitoramento contínuo da resposta ao tratamento é fundamental. Consultas de acompanhamento permitem ajustes no tratamento e garantem a resolução da inflamação (PERIC et al., 2024).

A abordagem terapêutica para a estomatite protética é baseada nos achados diagnósticos e pode incluir várias medidas. A higiene oral adequada é fundamental e inclui a limpeza regular das próteses e a remoção das mesmas durante a noite para reduzir a colonização por microrganismos. Ajustes na prótese

são necessários para eliminar pontos de pressão e garantir um encaixe confortável, evitando traumatismos na mucosa oral (SALERNO et al., 2011; PERIC et al., 2024)

O uso de antifúngicos pode ser tópico, com aplicação de substâncias como nistatina ou miconazol diretamente na prótese e na mucosa afetada, ou sistêmico, com prescrição de medicamentos como fluconazol nos casos mais graves ou persistentes (MCREYNOLDS et al., 2023)

Além disso, a terapia fotodinâmica, que envolve a aplicação de azul de metileno na área afetada seguida da irradiação com laser, é uma opção eficaz na eliminação de microrganismos patogênicos, incluindo fungos, e na promoção da cicatrização da mucosa. Essa combinação de métodos clínicos, laboratoriais e terapias avançadas ajuda a garantir um diagnóstico preciso da estomatite protética, permitindo um tratamento eficaz que melhora a qualidade de vida dos pacientes afetados, aliviando os sintomas e prevenindo recorrências

2.2 TERAPIA ANTIFÚNGICA

O manejo da estomatite protética deve abranger o diagnóstico precoce, a correção dos fatores predisponentes e a manutenção de uma higiene oral adequada. A seleção do antifúngico apropriado deve levar em conta a extensão e a gravidade da infecção, bem como os possíveis efeitos colaterais dos medicamentos e as interações medicamentosas (AKPAN & MORGAN, 2002; ESPINEL-INGROFF, 2008).

Atualmente, várias drogas antimicrobianas podem ser utilizadas no tratamento das infecções causadas por fungos. Porém, essa "diversidade" torna-se relativamente pequena quando comparada ao arsenal de drogas disponíveis para o tratamento de infecções bacterianas. Isso é atribuível à natureza eucariótica das células fúngicas e à dificuldade de encontrar alvos únicos não compartilhados com hospedeiros humanos (ESPINEL-INGROFF, 2008; PATIL et al., 2015).

Os antifúngicos atualmente disponíveis no mercado podem ser categorizados com base em seus alvos específicos dentro das células fúngicas. As principais classes desses medicamentos incluem os polienos, que se ligam ao ergosterol na membrana celular; os inibidores da biossíntese do ergosterol, que são subdivididos em azólicos e alilaminas e atuam impedindo a formação desse componente essencial da membrana fúngica; os antimetabólicos, que interferem na síntese de ácidos nucleicos; e as equinocandinas, que inibem a síntese do β -(1,3)-D-glucano,

um componente vital da parede celular dos fungos. Cada uma dessas classes oferece mecanismos de ação distintos que são essenciais para o tratamento eficaz das infecções fúngicas (ESPINEL-INGROFF, 2008; PATIL et al., 2015; QUINDÓS et al., 2019).

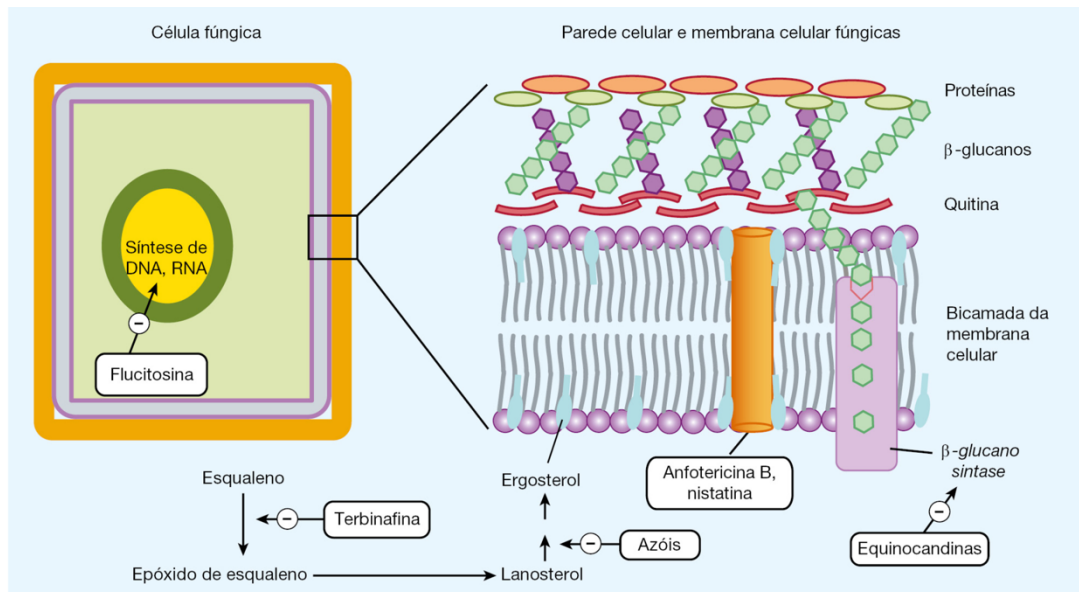


Figura 3: Mecanismo de ação dos agentes antifúngicos conforme seu alvo de atuação.

Os antifúngicos tópicos são frequentemente recomendados como primeira linha de tratamento para casos não complicados de candidíase oral, incluindo a estomatite protética. Entre os principais agentes tópicos utilizados estão a nistatina e o miconazol (PATIL et al., 2015; LYU et al., 2016).

A nistatina (Figura 4) é um polieno que atua ligando-se aos esteróis na membrana celular do fungo, especificamente ao ergosterol, que é um componente essencial da membrana celular fúngica. A ligação da nistatina ao ergosterol forma poros na membrana celular, o que aumenta a permeabilidade da membrana. Esses poros permitem a saída de íons e outras moléculas essenciais da célula, resultando na perda de componentes intracelulares vitais, levando ao colapso das funções celulares e, eventualmente, à morte da célula fúngica. A nistatina é eficaz contra diversas espécies de *Candida*, incluindo *Candida albicans*, a espécie mais comumente associada à estomatite protética (QUINDÓS et al., 2019).

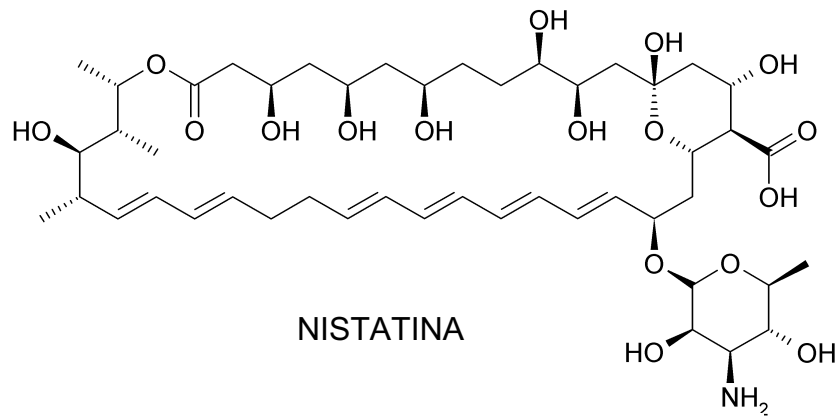


Figura 4: Estrutura química da Nistatina
Disponível em: <https://encurtador.com.br/J8aBq>
Acesso em: 22/06/2024

A nistatina está disponível em várias formas de apresentação, o que facilita sua aplicação em diferentes condições clínicas e preferências dos pacientes:

- **Suspensão Oral:** A suspensão oral de nistatina é uma das formas mais comuns para o tratamento da candidíase oral. Os pacientes devem manter a suspensão na boca por um tempo antes de engolir, permitindo que o medicamento entre em contato com as áreas afetadas. Esta forma é especialmente útil para pacientes com dificuldade em usar outras formas de medicação (LYU et al., 2016).
- **Crems e Pomadas:** Embora menos comuns para uso oral, os cremes e pomadas de nistatina são frequentemente usados para infecções fúngicas na pele e mucosas. Eles podem ser aplicados diretamente nas áreas afetadas e são eficazes para tratar candidíase em áreas externas da boca, como os lábios e cantos da boca (queilite angular) (AKPAN & MORGAN, 2002).

A nistatina é um medicamento amplamente disponível e de acesso relativamente fácil. No Brasil, pode ser adquirida em farmácias com ou sem prescrição médica, dependendo da regulamentação local. Como é de baixo custo, torna-se uma opção acessível para muitos pacientes. Além disso, é frequentemente incluída na lista de medicamentos essenciais da OMS e está disponível através do Sistema Único de Saúde (SUS) em várias apresentações, garantindo que pacientes com candidíase oral, incluindo aqueles com estomatite protética, possam ter acesso ao tratamento adequado (LYU et al., 2016; QUINDÓS et al., 2019, BRASIL, 2020).

Esse medicamento continua sendo uma opção terapêutica fundamental no tratamento da candidíase oral devido à sua eficácia, segurança e diversidade de formas de apresentação. Sua ampla disponibilidade e baixo custo a tornam uma escolha de primeira linha para muitos casos de estomatite protética proporcionando alívio eficaz dos sintomas e contribuindo para a melhoria da saúde bucal dos pacientes (LYU et al., 2016; QUINDÓS et al., 2019).

Os azóis representam a maior classe de agentes antifúngicos, caracterizando-se por compostos sintéticos heterocíclicos com anel pentagonal (MURRAY et al., 2014). Esses agentes são divididos em duas famílias principais com base no número de átomos de nitrogênio presentes no anel azólico: os imidazólicos, que possuem dois átomos de nitrogênio, e os triazólicos, que contêm três átomos de nitrogênio (MATHEW; NATH, 2009).

A família dos imidazólicos inclui antifúngicos como o miconazol, cetoconazol, clotrimazol e econazol, todos amplamente utilizados no tratamento de diversas infecções fúngicas. Esses compostos são conhecidos por sua eficácia no combate a fungos ao interferir na biossíntese do ergosterol, um componente essencial da membrana celular fúngica, levando à disfunção e morte celular (QUINDÓS et al., 2019; EL-GANINY et al., 2022).

Por outro lado, a família dos triazólicos é subdividida em duas gerações. A primeira geração inclui o fluconazol e itraconazol, que têm demonstrado grande eficácia contra uma ampla gama de infecções fúngicas. A segunda geração de triazólicos, composta por voriconazol, posaconazol e ravuconazol, oferece uma cobertura ainda mais ampla e é particularmente eficaz contra espécies de fungos resistentes a outros antifúngicos. Esses triazólicos de segunda geração são frequentemente utilizados em infecções fúngicas invasivas e complexas, onde a resistência e a gravidade da infecção representam desafios significativos para o tratamento (KESSLER et al., 2022).

Esta classificação e subdivisão dos azóis destacam a importância desses compostos no arsenal terapêutico antifúngico, permitindo uma abordagem mais direcionada e eficaz no tratamento de infecções fúngicas variadas (QUINDÓS et al., 2019; EL-GANINY et al., 2022).

Miconazol (Figura 5), um imidazol de primeira geração, pode ser utilizado na forma de gel oral. Este gel tem mostrado eficácia significativa contra infecções fúngicas, incluindo aquelas causadas por *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e

Candida tropicalis. No entanto, seu uso pode estar associado a efeitos colaterais como náuseas e vômitos. A escolha entre miconazol e outros agentes antifúngicos tópicos deve considerar a aceitabilidade pelo paciente e a presença de fatores de risco adicionais, como xerostomia ou diabetes, que podem afetar a eficácia do tratamento e a tolerabilidade do medicamento (ZHANG et al., 2016; QUINDÓS et al., 2019).

Quando a terapia tópica não é eficaz ou em casos de infecção mais disseminada, antifúngicos sistêmicos são indicados. O fluconazol (Figura 6) é o antifúngico sistêmico mais comumente utilizado devido à sua eficácia e perfil de segurança. É um triazol que inibe a síntese de ergosterol na membrana celular do fungo, levando à destruição celular. Sua boa absorção gastrointestinal e altos níveis de concentração na saliva e nos tecidos bucais o tornam uma escolha adequada para o tratamento de candidíase oral persistente (PATIL et al., 2015; QUINDÓS et al., 2019).

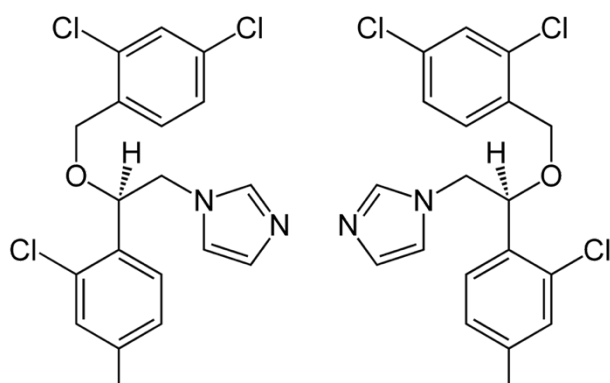


Figura 5: Estrutura química do miconazol
Disponível em: <https://encurtador.com.br/uolf8>
Acesso em: 22/06/2024

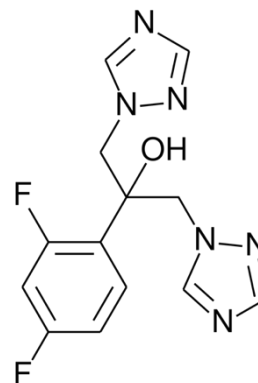


Figura 6: Estrutura química do fluconazol
Disponível em: <https://encurtador.com.br/UZjkg>
Acesso em: 22/06/2024

Além do fluconazol, o itraconazol pode ser utilizado em casos de resistência ao fluconazol ou em infecções por espécies não-albicans de *Candida*. O itraconazol possui um espectro de atividade mais amplo, sendo eficaz contra várias espécies de fungos. No entanto, é importante monitorar possíveis efeitos adversos e interações medicamentosas, especialmente em pacientes idosos ou imunocomprometidos. A escolha do itraconazol deve ser feita com cautela, considerando a condição clínica do paciente e a possibilidade de interações com

outros medicamentos que o paciente possa estar utilizando (ESPINEL-INGROFF, 2008; QUINDÓS et al., 2019).

Os alvos antifúngicos são limitados devido às semelhanças estruturais entre as células fúngicas e humanas. Como consequência, as opções de tratamento são restritas, favorecendo o surgimento de resistência antifúngica. Essa constatação destaca a importância de compreender os mecanismos e os efeitos da resistência, o que pode levar a abordagens terapêuticas mais eficazes (BOHNER et al., 2022).

Diversos mecanismos bioquímicos contribuem para o desenvolvimento da resistência antifúngica. Entre eles estão: alterações no alvo molecular do fármaco, superexpressão de bombas de efluxo, mudanças na biossíntese do ergosterol, perda de porinas, superexpressão da molécula alvo e produção de enzimas fúngicas que degradam o medicamento (ESPINEL -INGROFF, 2008; CASTANHEIRA et al., 2017; QUINDÓS et al., 2019).

A resistência aos azóis em espécies de *Candida* ocorre principalmente através do efluxo ativo de drogas, mediado por transportadores de cassete de ligação de ATP (ABC) e bombas da superfamília de facilitadores principais (MFS), codificados pelos genes CDR e MDR. Esses transportadores reduzem a concentração intracelular do medicamento, dificultando a obtenção do efeito terapêutico desejado. O transportador ABC CDR1 é um fator importante na resistência aos azóis em *C. albicans* e *C. glabrata*. Em *C. tropicalis*, a principal causa de resistência é a mutação no gene ERG11, embora a superexpressão dos genes CDR1 e MDR1 também contribua significativamente (CASTANHEIRA et al., 2017; QUINDÓS et al., 2019).

Além do efluxo de drogas, a resistência pode envolver a modificação da enzima-alvo ou a superexpressão do gene ERG11, que codifica a enzima C-14- α -desmetilase, diminuindo a eficácia dos derivados triazólicos. Mutações no gene ERG3 podem alterar a via do ergosterol, neutralizando os efeitos dos azóis (CASTANHEIRA et al., 2017; QUINDÓS ET al., 2019).

Em relação aos polienos, como nistatina e anfotericina B, a resistência pode surgir devido a mutações nos genes responsáveis pela síntese de ergosterol (ERG1, ERG25) e β -1,6-glucano (SKN1, KRE1), especialmente em espécies formadoras de biofilmes. Alterações nos genes ERG, como ERG5, ERG6 e ERG25, resultam em menor sensibilidade aos polienos devido à ausência de ergosterol na célula fúngica (CASTANHEIRA et al., 2017; PAUL et al., 2022).

Nos últimos anos, os medicamentos disponíveis na prática clínica têm sido insuficientes para atender à crescente demanda por tratamentos de infecções causadas por espécies de *Candida*. Isso se deve à resistência natural ou adquirida aos antifúngicos, bem como aos efeitos adversos e toxicidade de alguns medicamentos. Esse cenário destaca a necessidade urgente de novas moléculas sintéticas com melhores perfis microbiológicos (CASTANHEIRA et al., 2017; QUINDÓS et al., 2019).

Diante da resistência das espécies de *Candida* aos antifúngicos sintéticos, tem-se observado o uso de produtos naturais como uma tentativa de melhorar a eficácia contra esses micro-organismos. O emprego de fitoterápicos como tratamento alternativo destaca-se por sua diversidade molecular superior à dos compostos sintéticos, permitindo novas descobertas. Pesquisas sobre suas atividades biológicas podem contribuir para a prevenção e tratamento de diversas doenças (ESPINEL -INGROFF, 2008; CASTANHEIRA et al., 2017; QUINDÓS et al., 2019; EL-GANINY et al., 2022).

2.3 INOVAÇÕES DOS PRODUTOS E TERAPÊUTICAS PARA O TRATAMENTO DOS AGRAVOS EM SAÚDE

A busca por inovações nos produtos e terapêuticas para os problemas de saúde bucal é uma necessidade constante na odontologia. Explorar novos compostos naturais tem se mostrado uma abordagem promissora devido à sua eficácia potencial e menor toxicidade em comparação aos tratamentos convencionais (CHENG et al., 2015; ARA et al., 2018; FREIRE; ROSALEN, 2016).

Embora muitos estudos investiguem os efeitos biológicos dos produtos naturais, apenas uma pequena parte chega à fase clínica e se torna comercialmente disponível. Isso mostra a importância de uma pesquisa bem estruturada, que ofereça evidências sólidas para justificar os testes clínicos (FREIRE; ROSALEN, 2016).

Desenvolver novos produtos terapêuticos para tratar doenças bucais, como a estomatite protética, é essencial para lidar com a resistência microbiana e os efeitos colaterais dos tratamentos atuais (FREIRE; ROSALEN, 2016).

Newman; Cragg (2016), observam um interesse crescente em abordar diversas condições dentárias, especialmente mucosite oral, periodontite e cárie dentária. Este avanço reflete o interesse tanto da academia quanto da indústria em

criar terapias inovadoras baseadas em produtos naturais. Formas de aplicação tópica, como enxaguantes bucais, pastas de dentes e géis, são preferidas por serem menos invasivas e fáceis de usar.

Cheng et al. (2015), destacam a importância da integração de tecnologias modernas, como bioinformática e triagem de alto rendimento, para identificar novos alvos moleculares e caracterizar completamente os extratos e moléculas antes dos testes clínicos. Essas ferramentas permitem uma análise detalhada da bioatividade, toxicidade local ou sistêmica, farmacocinética e farmacodinâmica dos compostos naturais. Isso reduz o risco de falhas em estágios mais avançados da pesquisa e diminui os custos financeiros. Além disso, a colaboração interdisciplinar, envolvendo especialistas em diversas áreas, é fundamental para uma compreensão completa das doenças e para o desenvolvimento de tratamentos eficazes.

A aceitação da população em relação aos medicamentos de origem natural é amplamente positiva. Isso se deve, em parte, ao crescente interesse por tratamentos mais naturais e sustentáveis, bem como à valorização do conhecimento tradicional e etnomedicina. A segurança percebida e a eficácia comprovada de muitos desses produtos ao longo dos séculos reforçam a confiança dos pacientes e profissionais de saúde em sua utilização (JEON et al., 2011)

No âmbito ambiental, a pesquisa sobre produtos naturais também é promissora. A exploração sustentável de recursos naturais para a produção de medicamentos pode reduzir a dependência de processos químicos industriais, diminuindo o impacto ambiental. Além disso, a bioprospecção – a busca por novos compostos bioativos em plantas e outros organismos – promove a conservação da biodiversidade, incentivando a preservação de ecossistemas e espécies ameaçadas (KURNAZ; KURNAZ, 2021)

Nos últimos anos, a pesquisa com produtos naturais na odontologia tem gerado produtos tópicos para o cuidado oral, mas ainda há um longo caminho a percorrer até que medicamentos sistêmicos com eficácia clínica comprovada sejam desenvolvidos, os estudos apontam que a maioria das pesquisas se concentram em aspectos gerais, como os efeitos inibitórios microbianos, sem abordar os mecanismos específicos das doenças, isso resulta em um entendimento limitado dos mecanismos de ação e da eficácia dos compostos testados, superar essas limitações exige um investimento contínuo em pesquisa básica e aplicada, além de ensaios clínicos bem desenhados (ROSALEN et al., 2016; MISHRA et al., 2020).

Em suma, a busca por novos produtos e terapias para as afecções bucais é um campo promissor, mas ainda pouco explorado. Os produtos naturais oferecem uma alternativa valiosa aos tratamentos convencionais, mas requerem uma abordagem rigorosa e multidisciplinar para garantir sua eficácia e segurança. O desenvolvimento de novos tratamentos depende tanto de avanços tecnológicos quanto de uma colaboração efetiva entre academia, indústria e profissionais de saúde. Com o devido investimento e pesquisas bem delineadas, é possível transformar descobertas científicas em soluções terapêuticas eficazes para a saúde bucal (ROSALEN et al., 2016; NEWMAN et al., 2016).

Nesse contexto, o geraniol (Figura 7) é um monoterpreno isoprenóide acíclico derivado de óleos essenciais de diversas plantas aromáticas, conhecido por suas múltiplas atividades biológicas. Este composto é particularmente notável por sua atividade antifúngica contra várias cepas de *Candida* spp., incluindo *Candida albicans*, um patógeno responsável por infecções em pacientes imunocomprometidos (SINGULANI et al., 2018).

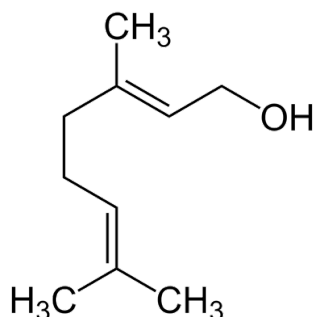


Figura 7: Estrutura química do geraniol
Fonte: Google Imagens

Geraniol é amplamente distribuído em diversos tecidos vegetais e geralmente encontrado em conjunto com seus produtos de oxidação, como geranial e neral, que são isômeros do citral. A substância conhecida como “geraniol” é, na verdade, uma mistura de dois isômeros: o isômero trans, chamado de geraniol, e o isômero cis, conhecido como nerol.

Estudos demonstram que o geraniol pode inibir a formação de biofilmes e morfogênese de hifas, essenciais para a virulência de *Candida albicans*, através da regulação negativa da ATPase da membrana plasmática e redução dos níveis de ergosterol. Além disso, o geraniol afeta a função mitocondrial, quebra a homeostase do ferro e mitiga a toxicidade, o que contribui para sua ação antifúngica

abrangente (LEITE et al., 2015).

Além da atividade antifúngica, o geraniol possui notáveis potenciais terapêuticos. Este composto tem demonstrado efeitos hepatoprotetores significativos, especialmente em modelos de esteatohepatite não alcoólica induzida por dieta. A administração de geraniol em ratos mostrou uma redução nos marcadores de inflamação hepática e fibrose, bem como uma melhora nas funções mitocondriais (QUEIROZ et al., 2017).

Estudos indicam que o geraniol inibe as atividades da alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), reduzindo o estresse oxidativo e promovendo a regeneração celular hepática, essas propriedades tornam o geraniol um candidato promissor para o tratamento de doenças hepática (CHEN et al., 2016).

A citotoxicidade do geraniol é outra área de interesse, particularmente em estudos relacionados ao câncer. Pesquisas mostram que o geraniol pode inibir o crescimento de células de câncer de cólon e induzir apoptose, caracterizada pelo aumento da expressão de Bax (um regulador pró-apoptótico) e redução de Bcl-2 (um regulador anti-apoptótico). Além disso, o geraniol causa danos ao DNA e bloqueia o ciclo celular, o que contribui para sua eficácia antitumoral, esses efeitos citotóxicos destacam o potencial do geraniol como um agente anticancerígeno em tratamentos futuros. (QI et al., 2018),

Outro aspecto do geraniol é sua atividade anti-inflamatória e antioxidante. Estudos demonstram que este composto pode atenuar a resposta inflamatória e o estresse oxidativo em diversos modelos experimentais. Por exemplo, o geraniol reduz a produção de prostaglandina E2 e óxido nítrico, mediadores inflamatórios, e aumenta a atividade de enzimas antioxidantes como a glutathione (GSH). Além disso, o geraniol modula vias de sinalização celular, como a NF- κ B e COX-2, que estão envolvidas na resposta inflamatória, conferindo-lhe propriedades protetoras contra danos celulares (KHAN et al., 2013).

Adicionalmente, o geraniol tem sido investigado por seu potencial mutagênico. Em estudos com células humanas, como linfócitos periféricos e células HepG2, o geraniol mostrou efeitos genotóxicos em concentrações elevadas, evidenciando a necessidade de avaliação cuidadosa de suas doses terapêuticas. Estudos in vitro indicam que concentrações elevadas de geraniol podem induzir quebras de DNA e aberrações cromossômicas, ressaltando a importância de se

balancear suas propriedades terapêuticas com seu potencial genotóxico (SINGULANI et al., 2018).

Por fim, o geraniol é encontrado em uma variedade de plantas, incluindo *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Rosa spp.* (rosas), e *Pelargonium graveolens* (gerânio). Outras fontes notáveis incluem o *Zingiber officinale* (gengibre), *Thymus vulgaris* (tomilho), e *Lavandula angustifolia* (lavanda) – (Figuras de 8 a 13). Estas plantas são ricas fontes de óleos essenciais que contêm geraniol, amplamente utilizados não apenas na medicina tradicional, mas também nas indústrias de fragrâncias e cosméticos. A diversidade de plantas que produzem geraniol reforça sua importância como um composto natural com múltiplas aplicações terapêuticas (LEI et al., 2018)

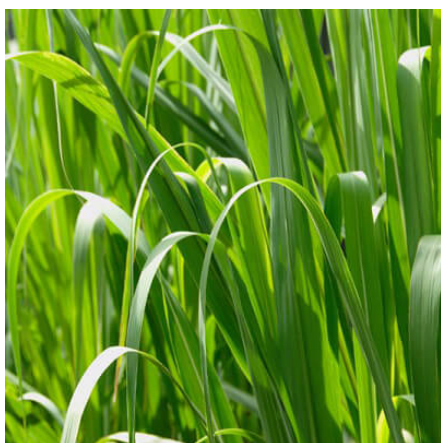


Figura 08: *Cymbopogon martinii*
Fonte: Google Imagens



Figura 09: *Rosa spp.*
Fonte: Google Imagens



Figura 10: *Pelargonium graveolens*
Fonte: Google Imagens



Figura 11: *Zingiber officinale*
Fonte: Google Imagens



Figura 12: *Thymus vulgaris*
Fonte: Google Imagens



Figura 13: *Lavandula angustifolia*
Fonte: Google Imagens

3.1 OBJETIVOS

3.2 Objetivo geral

- Avaliar as atividades antifúngica, citotóxica e mutagênica do geraniol contra espécies de *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de pacientes com estomatite protética.

3.3 Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) do geraniol contra diferentes cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis*, comparando com miconazol e nistatina.
- Elucidar os possíveis mecanismos do geraniol com ênfase sobre a parede celular e membrana plasmática fúngica.
- Comparar a atividade antifúngica do geraniol com miconazol e nistatina em cepas resistentes e sensíveis de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*.
- Determinar o Índice de Concentração Inibitória Fracionada (método de associação – *checkerboard*) do geraniol com os antifúngicos padrões;
- Demonstrar o potencial citotóxico através da atividade hemolítica em eritrócitos humanos dos tipos sanguíneos A, B e O
- Investigar o potencial genotóxico das substâncias, utilizando o teste de genotoxicidade em células de mucosa oral de humanos.
- Estudar as interações do geraniol com enzimas fúngicas alvo de *C. albicans* e *C. tropicalis* utilizando técnicas de docking molecular.

4. ARTIGO 1: Efficacy of Geraniol in Inhibiting Strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Isolated from Patients with Denture-Related Stomatitis

O manuscrito a seguir será submetido para publicação no periódico “Pharmaceuticals ISSN 1424-8247”.

Efficacy of Geraniol in Inhibiting Strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Isolated from Patients with Denture-Related Stomatitis

José Klidenberg de Oliveira Júnior¹

<https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>

Gustavo Medeiros Toscano da Silva²

<https://orcid.org/0000-0002-2454-9116>

Nayana Rocha Oliveira³

<https://orcid.org/0000-0002-6794-1601>

Cássio Ilan Soares Medeiros⁴

<https://orcid.org/0000-0002-6413-8303>

Edeltrudes de Oliveira Lima⁵

<https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>

1- Student of the Graduate Program in Dentistry at the Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

2- Dentist at the Municipal Health Department of Campina Grande, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

3- Student in the Graduate Program of Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

4- Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba, João Pessoa 58059-900, Brazil.

5- Professor in the Graduate Program of Natural and Synthetic Bioactive Products and the Graduate Program in Dentistry at the Federal University of Paraíba, João Pessoa, Paraíba, Brazil.

Abstract: *Candida albicans* and *Candida tropicalis* species are frequently associated with denture stomatitis, a common fungal infection in denture wearers. Objective: This study evaluated the antifungal activity of geraniol against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, investigated their mechanisms of action, assays of association with licensed antifungals and conversions of molecular docking analyses. Antifungal activity was evaluated through Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicide Concentration (CFM) assays using the broth microdilution method. Sorbitol and ergosterol trials were performed to understand the mechanisms of action. Association studies with nystatin and miconazole were extended using the checkerboard technique to determine Fractional Inhibitory Concentration Indices (ICIF). Molecular docking was performed to predict the interactions of geraniol with ergosterol and key proteins of fungal cells. Geraniol showed MICs of 64 µg/mL for *C. albicans* and 32-64 µg/mL for *C. tropicalis*. CFM confirmed the fungicidal activity of geraniol. In tests with sorbitol, the MIC increased, demonstrating that geraniol destabilizes the fungal cell wall. In trials with ergosterol, MIC increased the presence of exogenous ergosterol, reducing direct interaction. The combination of geraniol and miconazole demonstrated significant synergism (ICIF = 0.25). Molecular docking corroborated the interaction of geraniol with ergosterol and other proteins. Geraniol is a promising therapeutic alternative for the treatment of oral fungal infections, contributing to the management of denture stomatitis and promoting new dental therapies.

Keywords: Geraniol, Antifungal Agents, *Candida* spp., Prosthetic stomatitis

Introduction

Denture stomatitis (DS) is an inflammation of the oral tissues that commonly occurs in denture wearers, with *Candida* infection being the main cause [1-4]. *C. albicans* is most commonly associated with this disease. In addition to *C. albicans*, other less common species such as *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis* and *C. krusei* can also occur in the oral microbiota and become pathogenic [5].

The causes of denture stomatitis are diverse, with *Candida* spp. Infections are the most common. Because it is often asymptomatic, many people do not know they have it. Treatment is essential as denture stomatitis can be a source of more serious infections [6]. It is important to note that *Candida*-associated denture stomatitis is difficult to treat and often recurs.

Two main chemical classes are used to treat denture stomatitis: azoles and polyenes [7,8]. The high relapse rates represent a worrying situation as failure of antifungal therapy can lead to prolonged illness, increased toxicity and even death. To address this problem, the World Health Organization (WHO) is encouraging further research to develop alternative therapies [9].

From this perspective, there is an increasing demand for new antifungals that are more effective and less toxic than those currently used. This has sparked an intensive search for various sources, including natural products. Nature-derived antifungal compounds such as terpenes have received a lot of attention recently. Due to their antimicrobial properties, they are considered a promising therapeutic option for treating fungal infections [8,9].

Terpenes are a group of natural plant-derived compounds formed by the combination of isoprene units (C_5H_8). They are divided into the most common monoterpenes (C_{10}) and sesquiterpenes (C_{15}). If a terpene contains oxygen, it is called a terpenoid [10].

Geraniol (3,7-dimethylocta-trans-2,6-dien-1-ol) is an acyclic monoterpene alcohol with the chemical formula $C_{10}H_{18}O$. The term geraniol refers to the natural mixture of two isomers: geraniol (trans) and nerol (cis). Geraniol is extensively used in the flavor and fragrance industries as one of their key molecules and is a frequent component in products from these sectors. Geraniol has a range of biochemical and pharmacological properties, including insecticidal and repellent capabilities, as well as anthelmintic, antibacterial, antioxidant, anticancer, and anti-inflammatory activities. The scientific literature also confirms the antifungal properties of these compounds [11].

As an antimicrobial agent, geraniol can disrupt microbial cell membranes, inhibit ergosterol synthesis in fungi, and penetrate resistant biofilms, showing effectiveness against a wide range of pathogens. This makes it a promising compound for developing new medications [12-14].

The study aims to investigate the antifungal activity of geraniol against *C. albicans* and *C. tropicalis* strains isolated from patients with denture stomatitis. To achieve this, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum fungicidal concentration (MFC) of geraniol were determined, along with its effects on fungal cell viability, cell wall, and cell membrane. Additionally, combination assays using the checkerboard method and molecular docking were performed.

Materials and Methods

Chemicals

The phytoconstituent included in the study, geraniol, along with other substances used in the analyses, such as sorbitol, ergosterol, nystatin, and miconazole, were purchased from Sigma-Aldrich®. For the antifungal activity evaluation assays, the products were weighed and dissolved in Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich®) 150 µL (3%) and Tween 80 (Sigma-Aldrich®) 100 µL (2%). The final volume was then adjusted with sterilized distilled water to a total of 3 mL. Subsequently, serial dilutions were made from 1,024 to reach 4 µg/mL using RPMI 1640 medium.

Culture media

The culture medium used for the antifungal activity assays was RPMI 1640 with glutamine and without bicarbonate (Sigma-Aldrich®, Stenheim, Germany). The products were prepared according to the manufacturer's instructions. The media were dissolved in autoclaved sterilized distilled water at 121°C for 15 minutes.

Fungal Strains

The strains of *C. albicans* and *C. tropicalis* tested were obtained from the collection of the Mycology Laboratory, Department of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Paraíba (LM, DCF, UFPB). They included 9 clinical strains of *C. albicans* isolated from the oral cavity and the base of the participant's prosthesis (LM-3P; LM-4B; LM-4P; LM-5B; LM-5P; LM-7B; LM-7P; LM-8B; LM-

8P) and one reference strain *C. albicans* ATCC 76645, as well as 6 strains of *C. tropicalis* (LM-2; LM-77; LM-96; LM-100; LM-202), including one reference strain ATCC 750.

Inoculum preparation

For the yeast inoculum preparation procedure, the isolates were cultured in slanted ASD medium at $35 \pm 2^\circ\text{C}$ for 24 hours (*overnight*). Suspensions of the microorganisms were prepared in tubes containing 5 mL of sterile 0.9% saline solution (Farmax - Distribuidor Ltd., Amaral, Divinópolis, MG, Brazil). These suspensions were then agitated for 2 minutes using a Vortex mixer (Fanem Ltd., Guarulhos, SP, Brazil).

After agitation, the turbidity of each suspension was compared and adjusted to match that of the barium sulfate suspension from tube 0.5 of the McFarland scale, which corresponds to an inoculum of approximately 10^6 CFU/mL. This suspension was then diluted with distilled water at a ratio of 1:10, resulting in an inoculum containing approximately 10^5 CFU/mL, which was used in the assays performed [15].

Determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC)

The antifungal potential of geraniol, nystatin, and miconazole (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil) against *Candida* strains was initially analyzed using the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) technique. In a 96-well microplate (ALAMAR®), 100 μL of liquid RPMI medium without bicarbonate (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil) was added to all wells [15], and 100 μL of the emulsions of the test substances were added to the first row of the microplate, all in double concentration [15].

Through a series of two-fold dilutions, concentrations ranging from 1024 to 4 $\mu\text{g/mL}$ were obtained. Finally, 10 μL aliquots of the fungal suspensions were added. The MIC was defined as the lowest concentration capable of completely inhibiting fungal growth after 48 hours at $35 \pm 2^\circ\text{C}$. The product was considered active when it inhibited at least 50% of the microorganisms used in the microdilution assays [16]. MIC activity was classified as strong, moderate, or

weak based on the following criteria: up to 600 µg/mL = strong activity, 600-1500 µg/mL = moderate activity, and ≥ 1500 µg/mL = weak activity [17].

After reading and determining the MIC, the MFC evaluation assay was performed. Aliquots of 10 µL of the supernatant from wells with complete fungal growth inhibition (MIC, 2xMIC, and 4xMIC) were taken and seeded onto new plates containing RPMI-1640 (Sigma-Aldrich®, São Paulo, Brazil). These were then incubated for 48 hours at 35 ± 2 °C. The MFC was defined as the lowest concentration of geraniol, nystatin, and miconazole that inhibited at least 50% of the microorganisms used in the biological assays [18,19]. The antifungal effect was considered fungicidal when the MFC/MIC ratio was 1:1 or 2:1, and fungistatic when the ratio was greater than 2:1.

Controls for sterility, cell viability, and 5% DMSO and 2% Tween 80 were performed. At the end of all procedures, the plates were closed, sealed, and incubated at a temperature of 35 ± 2 °C for 48 hours. After this period, the biological assays were read.

Determination of effects of geraniol on fungal cell wall

Sorbitol assay

The minimum inhibitory concentration (MIC) of geraniol was determined for *Candida albicans* and *Candida tropicalis* using the broth microdilution method in 96-well U-bottom plates, as previously described. For this assay, one clinical strain and one reference strain of each species were selected based on the criterion of the best results in preliminary MIC tests. If similar results were obtained between strains, the selection was made randomly.

Sorbitol was added to the culture medium as an osmotic support, reaching a final concentration of 0.8 M. A microorganism control was performed by adding 100 µL of RPMI medium with sorbitol (0.8 M), 100 µL of DMSO solution (5%), and Tween 80 (2%) dissolved in RPMI, along with 10 µL of the inoculum of each species. Additionally, a sterility control was performed by placing 200 µL of RPMI in a well without fungal suspension. The plates were aseptically sealed and incubated at 35-37°C for 48 hours before reading the results [20].

The MIC values of the products were compared in the absence and presence of sorbitol. The assays were conducted in triplicate, and the results were expressed as the geometric mean of the values obtained [20].

Ergosterol binding assay

MIC value determination in the presence of ergosterol

To determine whether geraniol binds to ergosterol in the fungal membrane, the MIC of this compound for *C. albicans* and *C. tropicalis* was determined using microdilution in a medium with and without the addition of ergosterol. If the product's activity is due to binding with ergosterol, the exogenous ergosterol will prevent binding to the fungal membrane ergosterol, and as a result, the MIC of this product is likely to increase in the presence of exogenous ergosterol compared to the control assay. If the MIC of the product remains unchanged in the presence of exogenous ergosterol, it suggests that this compound does not act by binding to membrane ergosterol. Similarly, it can be assessed whether this behavior is specific to ergosterol or occurs similarly with cholesterol [21].

The MIC determination of the products (geraniol, nystatin, and miconazole) against *C. albicans* and *C. tropicalis* strains (ATCC and clinical) was conducted by microdilution in 96-well microdilution plates, as previously described. The culture medium (RPMI) was used in the absence and presence of 400 µg/mL of ergosterol. A microorganism control was conducted by placing in the wells of the penultimate row of the plate 100 µL of DMSO solution (5%) plus Tween 80 (2%) dissolved in CSD with ergosterol and 10 µL of the inoculum of each species.

A sterility control was also performed by placing 100 µL of the culture medium in wells without the fungal suspension. The plates were sealed and incubated at 35-37°C for 24 - 48 hours before reading. The assays were performed in triplicate, and the results were expressed as the geometric mean of the outcomes [21].

Determination of the Fractional Inhibitory Concentration Index (Checkerboard Method) of Geraniol

The effect of combining geraniol with nystatin and geraniol with miconazole was analyzed using the checkerboard technique [22]. Initially, dilutions of the test drug solutions were prepared at 1/8 MIC, 1/4 MIC, 1/2 MIC, MIC, 2×MIC, 4×MIC, and 8×MIC in RPMI 1640. A 50 µL aliquot of geraniol was then added to the vertical wells of the plate, and 50 µL of a specific dilution of nystatin and miconazole were added horizontally. Finally, 100 µL of inoculum was added. The plates were sealed and incubated at 35±2°C for 48 hours for readings. The Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) was calculated as the sum of: FICA + FICB, where A represents geraniol, and B represents nystatin or miconazole. $FICA = (\text{MIC of A combined}) / (\text{MIC of A alone})$, while $FICB = (\text{MIC of B combined}) / (\text{MIC of B alone})$. The FICI was interpreted as follows: synergism (<0.5), additivity (0.5–1.0), indifference (>1.0 and <4.0), or antagonism (>4.0) [22].

Sterility controls, cell viability, 5% DMSO, 2% Tween 80, and the standard antifungal were tested. After completing all processes, the plates were closed, sealed, and incubated at 35±2°C for 48 hours, after which the biological assays were read.

Molecular Docking

Rigid molecular docking simulations were performed with the following proteins: sterol 14- α demethylase (CYP51) (PDB ID: 5TZ1) 2.0 Å and β -(1,3)-glucanase (PDB ID: 1EQC) from *C. albicans*. The structures were retrieved from the Protein Data Bank (PDB) and loaded into PyMol 2.5.3 to remove water molecules and co-crystallized ligands (oteseconazole and castanospermine, respectively). The geraniol ligand was constructed in Marvin Sketch 16.3.7, and using Avogadro 1.2.0 at pH 7.4 and Mopac 2012 at the PM6 level, energy minimizations and molecular optimization were performed with the AM1-BCC force field in Chimera 1.16, obtaining the .mol2 input file for the ligand [23,24].

Subsequently, the proteins were loaded into AutoDockTools 1.5.4 (ADT) [25] for the addition of polar hydrogens and Kollman charges, as well as the merging of non-polar hydrogens. Docking simulations were then carried out by identifying the active sites of the targets with the following grid centers: CYP51 (70.609; 66.284; 4.177 Å) and β -(1,3)-glucanase (34.786; 36.699; 56.278 Å), grid box dimensions (40 x 40 x 40), and spacing of 0.375 Å.

After locating the active sites, docking was performed using AutoDock 4.2, with 100 runs of the Lamarckian genetic algorithm and the default parameters of ADT. As a result, Binding Free Energy (ΔG) and Inhibitory Constant (K_i) values were generated, with the conformations showing the lowest ΔG values being selected. Finally, with the assistance of PyMol 2.5.3 and Discovery Studio 2021, the results were analyzed to determine the binding regions of the target with the ligand molecule, the types of interactions, and the active site amino acids involved in the binding. The methodology was validated through molecular redocking, which involves reflecting the position and orientation of the ligand found in the crystallographic structure and selecting the ligand conformation with the lowest Root Mean Square Deviation (RMSD) of the atomic distances, which should be ≤ 2.0 Å [26].

Results and Discussion

The results of this study demonstrated that geraniol has an MIC of 64 $\mu\text{g/mL}$ against 100% of the tested *Candida albicans* and *Candida tropicalis* strains. This value indicates a strong antifungal activity of geraniol, considering that, according to the literature, products with MICs below 100 $\mu\text{g/mL}$ are classified as having good antimicrobial activity (Table 1).

This result is consistent with the findings of Leite et al. [27], who investigated the antifungal activity of geraniol against *Candida albicans* strains isolated from blood cultures and pulmonary secretions. Geraniol exhibited an MIC of 16 $\mu\text{g/mL}$ for 90% of the samples tested.

Marcos et al. [28] investigated the antifungal efficacy of geraniol against isolates of *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. dubliniensis*, and *C. krusei* from denture wearers. The results indicated that

geraniol exhibited significant in vitro activity against both fluconazole-resistant and susceptible *Candida* isolates in a dose-dependent manner. Additionally, another study found that geraniol has a MIC of 100 µg/mL against *Streptococcus mutans*, one of the microorganisms responsible for the development of dental caries. Therefore, this compound shows potential for use in various formulations, including those aimed at preventing dental caries.

The MFC of geraniol was 128 µg/mL, inhibiting 82% of the entire sample used (Table 1). According to Siddiqui et al. [29], a substance exhibits fungistatic activity when the MFC/MIC ratio is ≥ 4 and fungicidal activity when the MFC/MIC ratio is < 4 . Hafidh et al. [16] state that a product is considered fungicidal when the ratio is 1:1 or 2:1 and fungistatic when the ratio is greater than 2:1.

According to these methodologies, the geraniol analyzed in the present study demonstrated fungicidal activity, offering several advantages over fungistatic agents. Geraniol's ability to directly kill fungal cells can significantly reduce the risk of infection recurrence, which is advantageous for immunocompromised patients or those with severe systemic infections, Shama et al. [30].

This finding is consistent with the study by Singh et al. [31], where geraniol was also considered fungicidal against *Candida albicans*. The study showed that geraniol possesses fungicidal action that is enhanced by inhibiting the efflux of CaCdr1p, an efflux pump that contributes to multidrug resistance (MDR), and by its synergy with fluconazole.

Table 1: Results of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC) Values

Fungos	Geraniol			Nystatin			Miconazole		
	MIC*	MFC*	MFC/MIC	MIC*	MFC*	MFC/MIC	MIC*	MFC*	MFC/MIC
<i>Candida albicans</i>									
ATCC -76645	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicide
LM-3P	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicide
LM-4B	64	128	Fungicide	32	128	Fungistatic	8	16	Fungicide
LM-4P	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicide
LM-5B	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicide
LM-5P	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicide
LM-7B	64	256	Fungistatic	32	64	Fungicide	8	16	Fungicide
LM-7P	64	64	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicide
LM-8B	64	64	Fungicide	32	128	Fungistatic	8	16	Fungicide
LM-8P	64	128	Fungicide	32	128	Fungistatic	8	16	Fungicide
<i>Candida tropicalis</i>									
ATCC-750	32	64	Fungicide	32	32	Fungicide	8	16	Fungicida
LM-2	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicida
LM-77	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicida
LM-96	64	256	Fungistatic	32	64	Fungicide	8	16	Fungicida
LM-100	64	256	Fungistatic	32	128	Fungistatic	8	16	Fungicida
LM-202	64	128	Fungicide	32	64	Fungicide	8	16	Fungicida

The sorbitol assays conducted in this research indicate that geraniol exerts its antifungal effect specifically through the cell wall in *C. albicans* strains. This is evidenced by the increase in MIC from 64 µg/mL to 256 µg/mL in the presence of sorbitol. This finding suggests that the mechanism of action of geraniol involves the disorganization of the cell wall, making fungal cells more susceptible to osmotic stress, resulting in their inhibition. In contrast, this effect was not observed in the other strains studied, as the concentration of the products needed to overcome the osmotic protection conferred by sorbitol did not increase (Table 2).

Table 2: Effect of Geraniol, Nystatin, and Miconazole Against *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in the Absence and Presence of 0.8 mol/L Sorbitol.

Fungal Strains	Geraniol (µg/mL)*		Nystatin (µg/mL)*		Miconazole (µg/mL)*	
	Absence of Sorbitol	Presence of Sorbitol	Absence of Sorbitol	Presence of Sorbitol	Absence of Sorbitol	Presence of Sorbitol
<i>C. albicans</i>						
ATCC -76645	64	256	32	32	8	32
LM – 4B	64	256	32	32	8	32
<i>C. tropicalis</i>						
ATCC - 750	64	64	32	32	8	32
LM - 77	64	64	32	32	8	32

The study conducted by Singh, Fátima, and Hameed [31] used a different methodology from the present study but demonstrated that geraniol causes the disruption of the cell wall integrity of *Candida albicans*. Additionally, the authors showed that geraniol blocks the calcineurin signaling pathway, a multifunctional regulator essential for cell growth and maintaining cell wall integrity under stress conditions.

Regarding the mechanism of action on ergosterol, it was observed that there was an increase in the MIC of geraniol and nystatin in the presence of 400 µg/mL ergosterol, with MIC values ranging from 64 to 256 µg/mL for *C. albicans* and from 32 to 512 µg/mL for *C. tropicalis*. This result suggests that geraniol interferes with the integrity of the fungal cell membrane, possibly through interaction with ergosterol.

Table 3: Effect of Geraniol Against *Candida albicans* and *Candida tropicalis* in the Absence and Presence of Ergosterol µg/mL.

Fungal Strains	Geraniol (µg/mL)*		Nistatina (µg/mL)*		Miconazol (µg/mL)*	
	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol	Absence of ergosterol	Presence of ergosterol
<i>C.albicans</i>						
ATCC -76645	64	256	32	256	8	32
LM – 4B	64	256	32	256	8	32
<i>C. tropicalis</i>						
ATCC - 750	64	256	32	512	8	32
LM - 77	64	256	32	512	8	32

*Modal Values of the Three Experiments

Similarly, in the study by Miron et al. [32], the antifungal activity of various monoterpenes, including geraniol, was evaluated against several species of pathogenic yeasts and dermatophytes. The researchers observed that geraniol shows affinity for ergosterol, suggesting that its mechanism of action is related to the destabilization of the fungal cell membrane. These findings support the results of the present study, indicating that the interaction of geraniol with ergosterol is an important mechanism for its antifungal action. On the other hand, Singh et al. [31] found that geraniol can affect cell membrane integrity and disrupt regulatory pathways, such as the calcineurin signaling pathway, in *Candida albicans*, partially supporting the results of the present study.

The results of the checkerboard assay for the combination of geraniol and nystatin, as well as geraniol and miconazole, on strains of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* provide important insights into the interactions of these compounds. For *Candida albicans* (LM – 4B), the combination of geraniol and nystatin showed an FICI index of 0.625, indicating additivity. This result suggests that the combination of the two agents may be more effective than using each one alone, although it did not reach a level of synergism.

Table 3: Determination of the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) for the Combination of Geraniol with Nystatin on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Strains Using the Checkerboard Method

Fungal Strains	ICIF Isolated MIC	ICIF Combined MIC	Index *ICIF
<i>C. albicans</i>			
ATCC - 76645	1	1	(2) Indifferent
LM – 4B	0,5	0,125	(0,625) Additivity
<i>C. tropicalis</i>			
ATCC - 750	1	1	(2) Indifferent
LM - 77	1	2	(3) Indifferent

*MIC, Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$); *FICI, fractional inhibitory concentration index

For *Candida albicans* (LM – 4B), the combination of geraniol and miconazole presented an FICI index of 0.25, indicating synergism. This finding is particularly significant as it suggests that the combination of these agents may result in a more potent antifungal effect, allowing for the use of lower doses of each compound to achieve the desired efficacy. In the other strains tested, the interactions were classified as indifferent, suggesting that, for these strains, the combination does not offer any additional benefit in terms of antifungal efficacy.

Table 5: Determination of the Fractional Inhibitory Concentration Index (FICI) for the Combination of Geraniol with Miconazole on *Candida albicans* and *Candida tropicalis* Strains Using the Checkerboard Method

Fungal Strains	ICIF Isolated MIC	ICIF Combined MIC	Índice *ICIF
<i>C. albicans</i>			
ATCC - 76645	1	1	(2) Indifferent
LM – 4B	0,125	0,125	(0,25) Synergism
<i>C. tropicalis</i>			
ATCC - 750	1	0,125	(1,125) Indifferent
LM - 77	4	0,125	(4,125) Indifferent

*MIC, Minimum Inhibitory Concentration ($\mu\text{g ml}^{-1}$); **FICI, Fractional Inhibitory Concentration Index.

The results presented are consistent with the findings of Khan et al. [33], who investigated the antibiofilm activity of various phytochemicals, including geraniol, and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. They demonstrated that the combination of geraniol with fluconazole can convert the fungistatic nature of fluconazole into fungicidal, enhancing its efficacy against *Candida* biofilm cells. This observation supports the findings of the present study, where the combination of geraniol and miconazole exhibited synergism, indicating a potential similar mechanism of action, where geraniol may enhance the efficacy of miconazole.

Regarding the results of the molecular docking, molecular redocking was initially performed, which involves removing the co-crystallized ligand and conducting docking simulations. This allowed for the calculation of binding energies (ΔG), inhibitory constants (K_i), and the RMSD values, which should be below 2.0 Å (Table 6), thereby validating the applied methodology.

The co-crystallized compound oteseconazole, a CYP51 inhibitor from *C. albicans* used as a positive control, binds to the active site of this enzyme and can block the synthesis of ergosterol, one of the main lipids of the fungal cell membrane, forming hydrophobic interactions with various residues. Notably, Pi-sigma interactions with Leu376 and Met508, as well as halogen bonds between fluorine and the Gly303 residue, were observed. Thus, the redocking provided structures with spatial arrangements (3D) similar to the crystallographic structure as well as the interactions with the enzyme's active site (2D) (Figure 1).

Similarly, the interactions of the co-crystallized castanospermine were observed, which binds to the active site of the β -(1,3)-glucanase enzyme from *C. albicans* and *C. tropicalis*, potentially inhibiting the synthesis of chitin, an important polymer of the fungal cell wall. From this interaction, the hydrogen bonds formed by the residues Glu27, His135, Asn191, Glu292, and Trp363 with the OH groups of castanospermine, as well as the formation of van der Waals hydrophobic interactions, stand out (Figure 2).

Next, docking was performed with geraniol and the CYP51 enzyme, which showed higher ΔG and K_i values compared to the co-crystallized ligand oteseconazole. Similarly, geraniol binds to the active site of β -(1,3)-glucanase with affinity comparable to the co-crystallized ligand castanospermine, given that the ΔG and K_i values are relatively close (Table 6).

Table 6: Binding Energies (ΔG) and Inhibitory Constants (K_i) of the Co-crystallized Ligands (Oteseconazole and Castanospermine) and the Geraniol Ligand Against the CYP51 and β -(1,3)-glucanase Enzymes of *C. albicans*.

Enzymes	Classification	ΔG (kcal/mol)	K_i	RMSD (Å)	ΔG (kcal/mol)	K_i
					Geraniol	
CYP51	Oxidoreductase	-8.26	877.07nM	0.716	-4.88	266.26μM
β -(1,3)-glucanase	Hydrolase	-5.35	120.72μM	0.624	-4.84	281.14μM

Figure 1. Redocking of Co-crystallized Oteseconazole with CYP51 (PDB ID: 5TZ1). a, 3D diagram of the co-crystallized ligand in green and the redocked ligand in blue. b and c, 2D diagrams showing the types of interactions of the oteseconazole molecule (co-crystallized and redocked) with the active site residues of the *C. albicans* CYP51 enzyme.

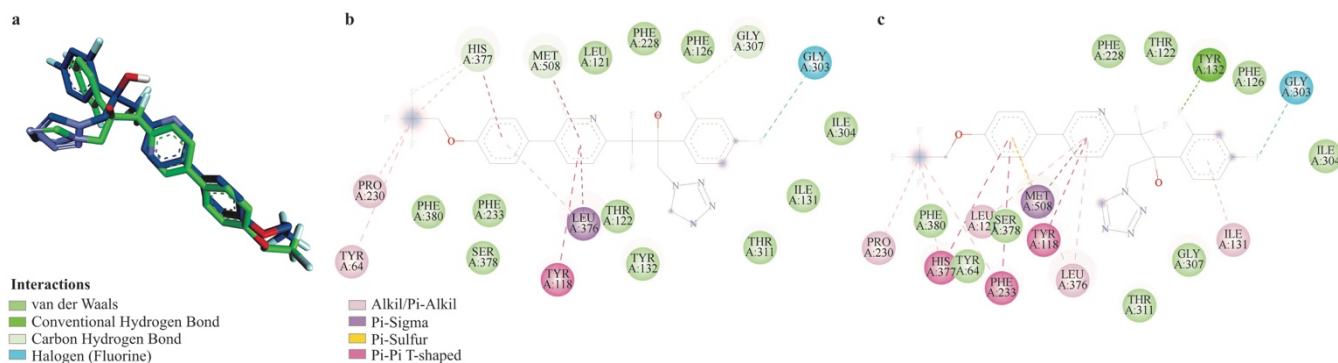
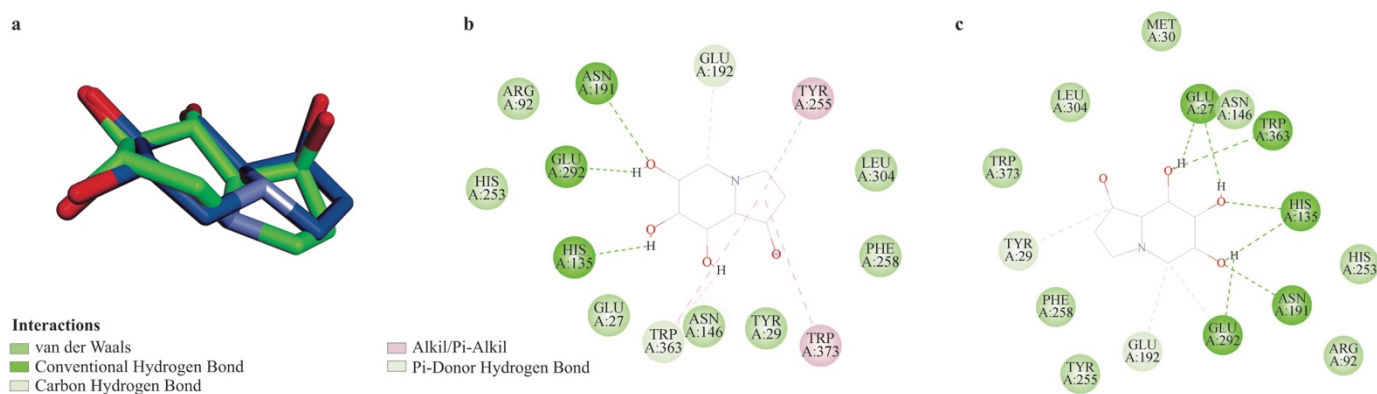


Figure 2. Redocking of Co-crystallized Castanospermine with β -(1,3)-glucanase (PDB ID: 1EQC). a, 3D diagram of the co-crystallized ligand in green and the redocked ligand in blue. b and c, 2D diagrams showing the types of interactions of the ligand molecule (co-crystallized and redocked) with the active site residues of the *C. albicans* β -(1,3)-glucanase enzyme.

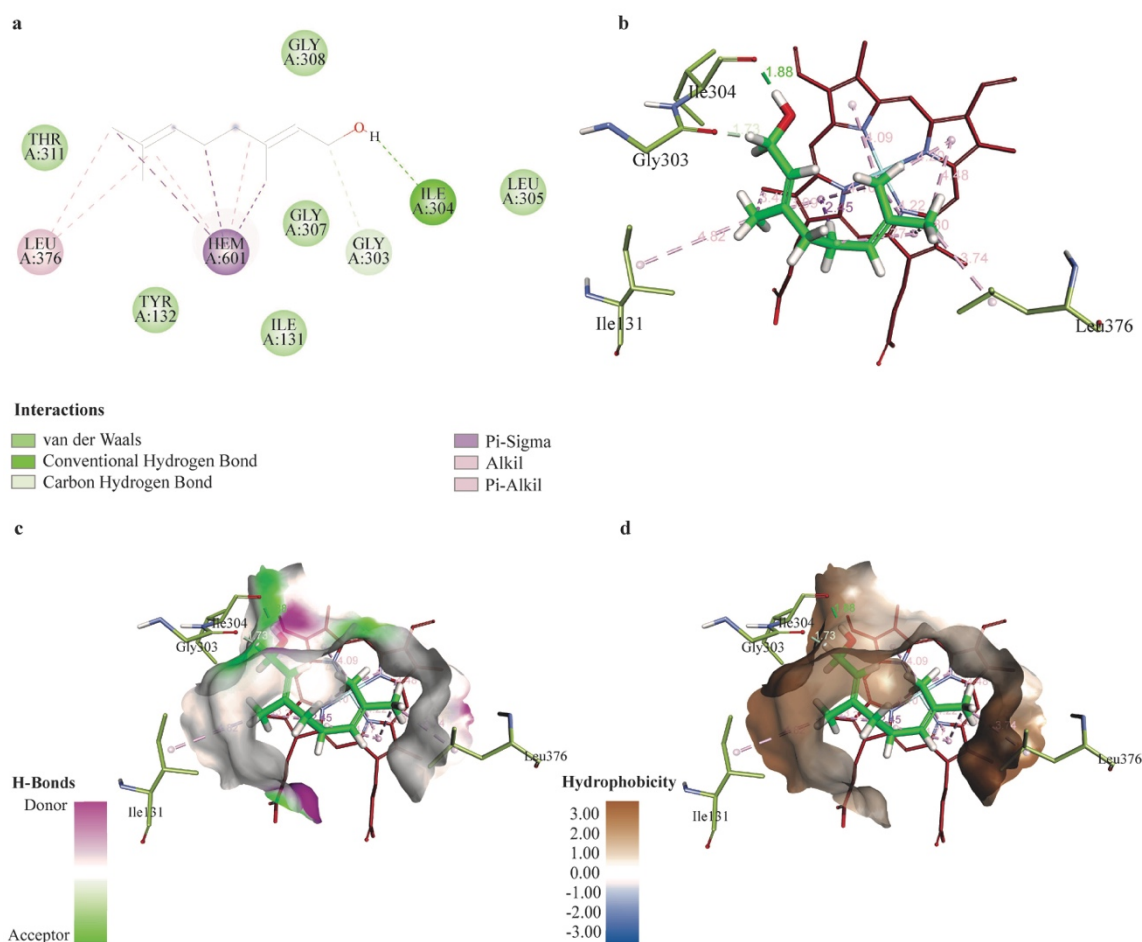


Geraniol interacted with the active site of the CYP51 enzyme through several types of bonds, including van der Waals, hydrogen bonding, carbon-hydrogen, Pi-sigma, alkyl, and Pi-alkyl interactions (Figure 2 A and B). Notably, there is a hydrogen bond between the -OH group of geraniol and the Ile304 residue (1.88 Å), as well as hydrophobic interactions between the carbons of geraniol and the heme group at the enzyme's active site (Figure 3a and b).

For this molecule, the relationships between the chemical groups of geraniol and the enzyme's active site were also observed on hydrogen donor-acceptor and hydrophobicity surfaces, highlighting the coherence of these interactions (Figure 3c and d). It is evident that the active site of CYP51 is

predominantly apolar, which is why it forms several hydrophobic interactions with the ligands under study. However, the co-crystallized ligand oteseconazole exhibits a higher affinity for CYP51 compared to geraniol, due to its larger molecular weight and spatial arrangement, as well as the relatively large active site of the enzyme, resulting in greater molecular complementarity.

Figure 3. Molecular Docking of the Geraniol Ligand with the Active Site of the CYP51 Enzyme (PDB ID: 5TZ1). a, main types of interactions between geraniol and the enzyme's active site in 2D. b, 3D distribution and distances of the chemical bonds between the geraniol ligand (green) and the amino acids and heme group of the enzyme's active site. c, 3D surface model of the enzyme's active site region occupied by the ligand (green) and the locations of hydrogen donors and acceptors. d, 3D surface model showing the regions of the ligand with varying degrees of hy



The molecular docking results demonstrate that geraniol exhibits significant affinity for the active site of the CYP51 and β -(1,3)-glucanase enzymes of *Candida albicans*. This affinity is comparable to the co-crystallized ligands oteseconazole and castanospermine, although geraniol shows slightly higher ΔG and K_i values, suggesting an effective interaction with these enzymes.

The study by Gupta [34] reinforces the antifungal efficacy of geraniol, showing that it can inhibit both planktonic growth and biofilm formation of *Candida glabrata*, as well as affect multiple cellular pathways, such as ergosterol synthesis and cell wall integrity [34]. This suggests that geraniol may act similarly in *C. albicans*, affecting key cellular pathways and contributing to its antifungal activity.

Additionally, Khan [33] demonstrates that geraniol has antibiofilm activity against *C. albicans* and is more active than some conventional antifungals, such as fluconazole and amphotericin B. It showed synergy when combined with fluconazole, enhancing treatment efficacy against established biofilms. These findings corroborate the potential of geraniol as an effective antifungal agent, acting on both planktonic growth and biofilm formation.

Thus, the molecular docking, combined with literature evidence, suggests that geraniol has promising potential as an antifungal agent against *Candida* species, acting through multiple pathways and with the potential to be used in combination with conventional antifungals to enhance treatment efficacy.

Conclusion

The geraniol shows effective antifungal activity against *Candida albicans* and *Candida tropicalis*, isolated patients with estomatite protection, and has high values of minimum initial concentration (CIM) and minimum fungicidal concentration (CFM).

The results suggest that geraniol exerts its fungicidal activity mainly due to the disorganization of cell fungi and interaction with ergosterol in the cell membrane, leading to mechanisms that confirm the action of sorbitol and ergosterol. In addition, a synthetic effect was found when combined with geraniol in combination with miconazole, which had the potential to benefit the combination with antifungal drugs. As simulations of molecular docking research linking geraniol to all enzymes, its therapeutic approach is valid. Importantly, this confirms the potential of geraniol as a therapeutic alternative for the treatment of fungal infections over time, especially in cases of estomatitis protection, and contributes to the development of new therapeutic measures in dentistry.

REFERÊNCIAS

1. Gendreau, L. ; Loewy, Z.G. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. J Prosthodont. **2011**, 20, 251-260.
2. Iosif, L. ; Preoteasa, C.T. ; Murariu-Magureanu, C. ; Preoteasa, E. Clinical study on thermography, as modern investigation method for Candida-associated denture stomatitis. Rom J Morphol Embryol. **2016**, 57, 191-195.
3. Yarborough, A. ; Cooper, L. ; Duqum, I. ; Mendonça, G. ; McGraw, K. ; Stoner, L. McGraw, k. Stoner, L. **2016**, 25, 288-301.
4. Rai, A. ; Hiray, A. ; Gedam, S. ; Bagwan, S. ; Gosavi, S. Nystatin effectiveness in oral candidiasis treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. Life. **2022**, 12, 1677.
5. Leite, D.P. ; Piva, M.R. ; Martins-Filho, P.R. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e a terapia fotodinâmica. Rev Odontol UNESP. **2015**, 44, 12-17.

6. Salerno, C. ; Pascale, M. ; Contaldo, M. ; Esposito, V. ; Busciolano, M. ; Guida, A. ; Petruzzi, M. ; Serpico, R. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. **2011**, 16, 139-143.
7. Pereira, J.M. ; Paiva, J.A. Tratamento da Candidíase Invasiva no Doente Crítico. *Rev Port Med Intensiva*. **2010**, 7, 23-30.
8. Menezes, E.A. ; Araújo, R.P. ; Guedes, G.M. ; Cunha, J.C. ; Oliveira, E.L. ; Dias, W.Q. Perfil de suscetibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. *Rev Patol Trop*. **2013**, 42, 49-55.
9. Barros, D.B. ; Lima, L.O. ; Silva, L.A. ; Fonseca, M.C. ; Ferreira, R.C.; Diniz-Neto, H. ; Alves, D.N. ; Rocha, W.P.S. ; Scotti, L. ; Lima, E.O. ; Sobral, M.V. ; Castellano, L.R.C. ; Moura-Mendes, J. ; Guerra, F.Q.S. ; Silva, M.V. α -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*. *Antibiotics*. **2023**, 12, 1-11.
10. Mamur, S. Geraniol, a natural monoterpene, identifications of cytotoxic and genotoxic effects in vitro. *J Essent Oil Res*. **2022**;34, 54-64.
11. Hacke, A.C.M.; D'Avila, S.F.; Lima D.; Rebuglio, V.J.C.; Teixeira, J.B, Marques, J.A.; Pereira,R.P. Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. *J Ethnopharmacol*. **2022**; 291,1-9.
12. Khan, S.M.A. ; Malik, A. ; Ahmad, I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol*. **2012**, 50, 33–42.
13. Queiroz, T.B. ; Santos, G.F. ; Ventura, S.C. ; Hiruma-Lima, C.A. ; Gaivão, I.O.M. ; Maistro, E.L. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). *Genet Mol Res*. **2017**, 16, 1-12.
14. Singulani, J.L. ; Pedroso, R.S. ; Ribeiro, A.B. ; Nicolella, H.D. ; Freitas, K.S. ; Damasceno, J.L. ; Vieira, T.M. ; Crotti, A. ; Tavares, D.C. ; Martins, C.H. ; Mendes-Gianni, M.J. ; Pires, R.H. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiol*. **2018**, 13, 1637-1646.
15. Rex, J.H. ; Alexander, B.D. ; Andes, D. ; Arthington-Skaggs, B. ; Brown, S.D.; Chatuvedi, V. ; Ghannoum, M.A. ; Espinel-Ingroff, A. ; Knapp, C.C. ;

- Ostrosky-Zeichner, L.O. ; Pfaller, M.A. ; Sheehan, D.J. ; Walsh, T.J. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3 and Supplement S. Wayne, PA: CLSI. **2017**, 28, 1-25.
- 16.** Hafidh, R.R. ; Abdulamir, A.S. ; Vern, L.S. ; Bakar, F.A. ; Abas, F. ; Jahanshiri, F. ; Sekawi, Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J.* **2011**, 5, 96.
 - 17.** Houghton, P.J. ; Howes, M.J. ; Lee, C.C. ; Steventon, G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol.* **2007**, 110, 391-400.
 - 18.** Ncube, N.S. ; Afolayan, A.J. ; Okoh, A. I. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotechnol.* **2008**, 7, 1797-1806.
 - 19.** Balouiri, M. ; Sadiki, M. ; Ibensouda, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J Pharm Anal.* **2016**, 6, 71-79.
 - 20.** Frost, D.J. ; Brandt, K.D. ; Cugier, D. ; Goldman, R. A whole-cell *Candida albicans* assay for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antibiot.* **1995**, 28, 306-309.
 - 21.** Escalante, A. ; Gattuso, M. ; Pérez, P. ; Zacchino, S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod.* **2008**, 71, 1720-1725.
 - 22.** Odds, F.C. Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**. 52,1.
 - 23.** Halgren T A. Force fields: MMFF94. *Encyclopedia of Computational Chemistry*. 2002
 - 24.** Hanwell, M.D. ; Curtis, D.E. ; Lonie, D.C. ; Vandermeersch, T. ; Zurek, E. ; Hutchison, G. R. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. *J Cheminform.* **2012**, 4.
 - 25.** Morris, G.M. ; Huey, R. ; Lindstrom, W. ; Sanner, M.F. ; Belew, R.K. ; Goodsell, D.S. ; Olson, A.J. Autodock4 and AutoDockTools4: Automated Docking with Selective Receptor Flexibility. *Journal of computational chemistry.* **2009**, 30, 2785-2791.

26. Bell, E.W. ; Zhang, Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. J Cheminform. **2019**, 11, 40.
27. Leite, M.C. ; Brito-Bezerra, A.P. ; Sousa, J.P. ; Oliveira, L.E. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. Med Mycol. **2015**, 53, 275-84.
28. Marcos-Arias, C. ; Eraso, E. ; Madariaga, L. ; Quindós, G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. BMC Complement Altern Med. **2011**, 11, 119.
29. Siddiqui, Z.N. ; Farooq, F. ; Musthafa, T.N.M. ; Ahmad, A. ; Khan, A.U. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of novel halopyrazole derivatives. J Saudi Chem Society. **2013**, 17, 237-243
30. Sharma, Y. ; Khan, L. ; Manzoor, N. ; Manzoor, N. Anti-*Candida* activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. J Mycol Med. **2016**, 26, 244-254.
31. Singh, S. ; Fatima, Z. ; Hameed, S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. Arch Microbiol. **2016**, 198, 459-472.
32. Miron, D. ; Battisti, F. ; Silva, F.K. ; Lana, A.D. ; Pippi, B. ; Casanova, B. ; Gnoatto, S. ; Fuentefria, A. ; Mayorga, P. ; Schapoval, E.E.S. Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. Rev Bras Farmacogn. **2014**, 24, 660-667.
33. Khan, M.S.A. ; Ahmad, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. J Antimicrob Chemother. **2012**, 67, 618-621.
34. Gupta, P.; Gupta, H.; Poluri, K.M. Geraniol eradicates *Candida glabrata* biofilm by targeting multiple cellular pathways. Appl Microbiol Biotechnol. **2021**, 105, 5589-5605.

5. ARTIGO 2: Geraniol and Its Effects on Human Cells: A Study of Cytotoxicity and Genotoxicity

O manuscrito a seguir foi submetido para publicação no periódico “The Scientific World Journal ISSN 2356-6140” e encontra-se em análise.

Geraniol and Its Effects on Human Cells: A Study of Cytotoxicity and Genotoxicity

José Klidenberg de Oliveira Júnior¹

<https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>

Luan Everton Galdino Barnabé²

luanevertongb@hotmail.com

Clarissa Lopes Drumond³

<https://orcid.org/0000-0001-8944-852X>

Nayana Rocha Oliveira⁴

<https://orcid.org/0000-0002-6794-1601>

Maria Alice Araújo de Medeiros⁵

<https://orcid.org/0000-0001-5563-7955>

Milena de Souza Alves⁶

<https://orcid.org/0000-0002-7981-7608>

Abrahão Alves de Oliveira Filho⁷

<https://orcid.org/0000-0002-7466-9933>

Edeltrudes de Oliveira Lima⁸

<https://orcid.org/0000-0002-9547-0886>

- 1- Universidade Federal da Paraíba - Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB, 58051-900, joseklidemberg@gmail.com.
- 2- Department of Dentistry, University Center of Patos Campina Grande (UNIFIP Campina Grande), Campina Grande, Paraíba, Brazil,
- 3- Centro Universitário Santa Maria, Rodovia BR 230, Km 504, 58900-000 cladrumond@hotmail.com.
- 4- Universidade Federal da Paraíba - Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB, 58051-900, nayrochy@hotmail.com.
- 5- Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos-PB, 58708-110 medeirosallice22@gmail.com.
- 6- Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos-PB, 58708-110, millenaasouzaa@gmail.com.
- 7- Universidade Federal de Campina Grande - Centro de Saúde e Tecnologia Rural, Patos-PB, 58708-110, abrahao.alves@professor.ufcg.edu.br.
- 8- Universidade Federal da Paraíba - Campus I - Cidade Universitária, João Pessoa - PB, 58051-900 edelolima@yahoo.com.br.

Abstract: The present study evaluated the cytotoxic and genotoxic effects of geraniol on human erythrocytes and oral mucosal epithelial cells, respectively. Geraniol was tested at concentrations of 50, 100, 500, and 1000 µg/mL. Cytotoxicity was assessed through a hemolysis assay conducted on erythrocytes of blood types A, B, and O, measuring the percentage of hemolysis at various concentrations. Genotoxicity was evaluated in oral mucosal epithelial cells collected with a cytobrush and exposed *ex vivo* to geraniol. The cells were fixed, stained with Giemsa, and analyzed for the presence of micronuclei, binucleation, karyolysis, karyorrhexis, and macronuclei. Approximately 1,000 cells per slide were examined to identify potential genetic damage. The results indicated that at low concentrations (50 to 100 µg/mL), geraniol did not exhibit significant cytotoxicity, with hemolysis remaining below 20%. However, at higher concentrations (500 to 1000 µg/mL), geraniol induced significant hemolysis, exceeding 80% in all tested blood types. In the genotoxic analysis, geraniol demonstrated a low genotoxic effect, with most cells remaining normal even at elevated concentrations. Cellular alterations such as micronuclei and binucleation were observed only at the 1000 µg/mL concentration, but to a lesser extent compared to the positive control. It is concluded that, although geraniol has therapeutic potential, its use at high concentrations should be approached with caution due to the risk of cytotoxicity. Further studies are required to define safe parameters for its clinical use.

Keywords: Geraniol; Monoterpenes; Cytotoxicity, Anti-genotoxicity.

Introduction

Geraniol, a monoterpene found in essential oils of various plants such as *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Rosa* spp. (rose), *Pelargonium graveolens* (geranium), *Zingiber officinale* (ginger), *Thymus vulgaris* (thyme), and *Lavandula angustifolia* (lavender), has been extensively studied due to its diverse biological properties, including antimicrobial, antioxidant, and anticancer activities. Owing to these properties, geraniol has been considered a potential therapeutic agent in various clinical and industrial applications [1].

However, despite its potential benefits, the use of geraniol at elevated concentrations raises concerns about its safety, particularly regarding its cytotoxic

and genotoxic effects [2]. Cytotoxicity, which refers to a substance's ability to cause cell damage, can have severe consequences, especially when it affects blood cells like erythrocytes, which are essential for oxygen transport and the maintenance of bodily homeostasis [3]. Similarly, genotoxicity, which involves damage to the genetic material of cells, can lead to mutations, cancer, and other genetic diseases if not properly controlled [2,3].

Previous studies indicate that geraniol may induce oxidative stress, a mechanism by which free radicals and other Reactive Oxygen Species (ROS) damage cellular components, including DNA and cell membranes. This oxidative stress can, in turn, lead to hemolysis in erythrocytes and genetic damage in other cell types. However, the extent of these effects and their implications for the safety of geraniol in therapeutic applications have not yet been fully elucidated [4].

Given the growing interest in the use of geraniol, it is essential to rigorously evaluate its cytotoxic and genotoxic effects to establish appropriate safety parameters [5,6]. Therefore, the objective of this study is to investigate the effects of geraniol on human erythrocytes, evaluating both induced hemolysis and potential genetic damage caused by this compound at different concentrations. Additionally, the study aims to identify the presence of cellular events indicative of genotoxicity, such as micronucleus formation, binucleation, karyolysis, karyorrhexis, and macronucleus formation in oral mucosal epithelial cells exposed to geraniol.

Materials and Methods

Study Location

The in vitro cytotoxicity and ex vivo genotoxicity analyses were performed at the Laboratory of Phytotherapy, Biochemistry, and Microbiology (LAFBIM) on the campus of the Federal University of Campina Grande, in the city of Patos, Paraíba, Brazil.

Geraniol Substance

The phytoconstituent included in the study, geraniol, was purchased from Sigma-Aldrich®. For the antifungal activity evaluation tests, the products were weighed and solubilized in Dimethyl sulfoxide (Sigma-Aldrich®) 150 µL (3%) and Tween 80 (Sigma-Aldrich®) 100 µL (2%). The final volume was then brought to 3 mL with sterilized distilled water.

Cytotoxic Potential in Human Erythrocytes (ABO System)

Aliquots of human blood (types A, B, and O) were mixed with 0.9% NaCl (1:30) and centrifuged at 2500 rpm for 5 min. After repeating this procedure twice, the sediment from the final centrifugation was resuspended in 0.9% NaCl to produce a 0.5% red blood cell suspension free of leukocytes and platelets. Then, 2 mL of red blood cell suspensions were treated with the test substance at concentrations of 50, 100, 500, and 1000 µg/mL. The samples were incubated for 1 hour at 22 ± 2 °C and kept under slow and continuous agitation (100 rpm). Subsequently, they were centrifuged at 2500 rpm for 5 min. Hemolysis was quantified by spectrophotometry at the maximum absorbance wavelength (540 nm). A suspension of red blood cells was used as a negative control (0% hemolysis), and another suspension of red blood cells with 1% Triton X-100 was used as a positive control (100% hemolysis) [7]. Each test was performed in triplicate, and the data were expressed as percentages of hemolysis, representing the arithmetic mean of three measurements.

The blood donor volunteers met the following inclusion criteria: over 18 years of age, no alcohol consumption within 48 hours before blood collection, no systemic diseases, no medication use within 72 hours prior to blood collection, no recent infectious diseases (within the last two weeks), non-smoker (or having ceased smoking at least 24 hours before collection), a body mass index (BMI) between 18.5 and 29.9 kg/m², not being pregnant or breastfeeding (for female donors), no history of autoimmune diseases or severe allergic reactions, and no blood donations or surgical procedures in the past three months. All volunteers agreed to participate in the study by signing the Informed Consent Form.

Additionally, this project was previously submitted to the Research Ethics Committee and was approved under the opinion no. 6.076.256 (Annex C).

Investigation of the Genotoxic Potential in Human Oral Mucosal Cells

Epithelial cells were collected from the left or right side of the oral mucosa using a cytobrush (endocervical sample/cell collector), considered the most appropriate instrument for obtaining exfoliated cells [8]. The cells were kept in a tube with 5 mL of 0.9% NaCl (cell preservation medium) until the slides were prepared.

Control cells were divided into two groups: those treated with hydrogen peroxide (0.0005%) (positive control) and those that received no treatment (negative control). The cells were washed twice in saline solution, centrifuged for 10 min at 1,500 rpm, and then kept in 5 mL of saline solution. The samples were washed once more and exposed ex vivo to the test substances at concentrations of 50, 100, 500, and 1000 µg/mL for 30 min. They were then centrifuged, and the supernatant was discarded. Before preparing the smears, the homogenized cells were vortexed onto slides, dried at room temperature, and fixed in methanol:acid (3:1) for 15 min [9,10].

The slides were kept at room temperature for 12 hours. After this period, they were immersed in distilled water for 1 min and stained with 2% Giemsa for analysis under optical microscopy [11]. Cellular toxicity was assessed by the presence of cellular indicators, such as micronucleus, binucleation, karyolysis, karyorrhexis, and macronucleus [12,13]. Approximately 1,000 cells were analyzed per slide.

The volunteers met the following inclusion criteria: over 18 years of age, no systemic diseases, no lesions or inflammation in the oral cavity, no use of antibiotics or anti-inflammatory drugs in the last two weeks, no invasive dental procedures in the past 30 days, non-smoker or having ceased smoking at least 30 days before collection, no alcohol consumption within 48 hours prior to sample collection, maintaining good oral hygiene, not being pregnant or breastfeeding, and agreeing to participate in the study by signing the Informed Consent Form.

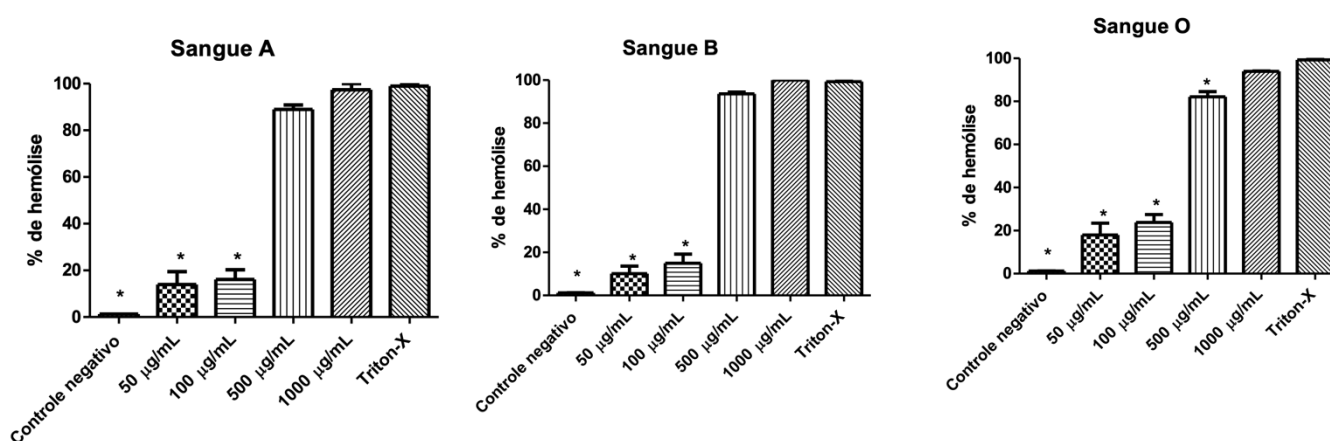
Additionally, this project was previously submitted to and approved by the Research Ethics Committee under approval number 6.076.256.

Results and discussion

Erythrocytes are particularly susceptible to damage induced by free radicals [14]. In this study, our results support the hypothesis that oxidative stress is a key factor in the induction of hemolysis. The destruction of erythrocytes was quantified and expressed as hemolytic potential, classified as low (0-40%), moderate (40-80%), or high (>80%) [7].

The analysis revealed that geraniol did not exert significant toxicity on ABO system erythrocytes at concentrations of 50 to 100 $\mu\text{g/mL}$. The hemolytic potential ranged from 18% to 95%, with low toxicity observed at concentrations of 50 to 100 $\mu\text{g/mL}$. However, at concentrations of 500 to 1000 $\mu\text{g/mL}$, geraniol induced hemolysis greater than 80% in all blood types evaluated (Figure 1).

Figure 1: Cytotoxic effect of geraniol against



Negative control (0.5% erythrocytes), positive control (1% Triton X-100). $P < 0.05$ (*), versus positive control

The results of the present study indicate that geraniol exerts significant cytotoxic effects on ABO system erythrocytes, particularly at higher concentrations (500 to 1000 $\mu\text{g/mL}$), where hemolysis exceeded 80% for all blood types evaluated.

These findings are consistent with previous studies that have also reported the cytotoxic effects of geraniol on different cell types. Hacke et al. [15] observed that geraniol demonstrated a significant reduction in cell viability in MCF-7 breast cancer cells, particularly at higher concentrations, similar to the effect observed on erythrocytes in our study. This cytotoxic effect was attributed, in part, to geraniol's

ability to generate reactive oxygen species, promoting oxidative stress and leading to programmed cell death (apoptosis).

Mamur [16] also identified cytotoxic and genotoxic effects of geraniol in human lymphocyte cells, observing that concentrations above 50 µg/mL significantly increased the frequency of chromosomal aberrations and DNA damage, as measured by the comet assay. These results suggest that geraniol, in addition to being cytotoxic, may also induce genetic damage, which could have important implications for its therapeutic application.

Despite the promising effects of geraniol as an antimicrobial and antiproliferative agent, our data and previous studies [16,17] indicate that its application at higher concentrations may be limited due to its potential to cause significant cytotoxicity. Therefore, determining a safe therapeutic window is essential for the clinical use of geraniol.

Additionally, the differences observed in cytotoxicity between studies may be attributed to variations in tested concentrations, cell types used, and methodologies employed. For example, while our study focused on erythrocytes, other studies investigated different cell types, such as cancer cells and lymphocytes, which may explain some of the variations in the results observed [16,17].

The results of the present study support the hypothesis that oxidative stress is a key factor in the induction of hemolysis in erythrocytes, especially at elevated geraniol concentrations. Previous studies have also identified geraniol as a compound with significant antioxidant properties. For example, it was demonstrated that geraniol attenuated oxidative stress and aluminum chloride-induced hepatopancreatic toxicity in rats by enhancing the activity of antioxidant enzymes such as glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD), and by reducing levels of malondialdehyde (MDA), a marker of lipid peroxidation [17].

This evidence suggests that the protective effects of geraniol observed in other oxidative stress models may extend to preserving erythrocyte integrity, provided it is used at appropriate concentrations [18]. However, the cytotoxicity observed at higher concentrations in the present study underscores the need for a cautious approach in using geraniol, considering that its efficacy and safety may vary depending on the dosage and the biological system in question.

Finally, it is important to emphasize that, while geraniol shows therapeutic potential, the risks associated with its use at high concentrations should not be underestimated. Further studies are needed to explore the underlying mechanisms of geraniol's cytotoxicity and to define safe concentrations for its use in therapies, especially in applications involving direct contact with blood cells or other sensitive tissues.

Genotoxicity tests assess the ability of extracts or substances, even at low concentrations, to interact with nucleic acids. Interaction with DNA can induce chromosomal aberrations and alterations in DNA structure, leading to irreversible cellular damage, such as necrosis or apoptosis, which can potentially be passed on to daughter cells during cell division [3,20].

Although cells possess DNA repair mechanisms, unrepaired lesions can result in mutations, which are associated with the development of various genetic diseases, particularly cancer [20,21,22].

Cellular toxicity was evaluated using indicators such as micronuclei, binucleation, karyolysis, karyorrhexis, and macronuclei. Geraniol induced few cellular alterations compared to the positive control, showing results closer to those of the negative control. Across all tested concentrations (50 to 1000 µg/mL), a high percentage of normal cells (>85%) was observed. However, at the concentration of 1000 µg/mL, some significant cellular alterations occurred, such as micronuclei, macronuclei, and binucleation (Table 1). Despite these alterations, the magnitude of the changes was less than that observed in the positive control, indicating a low genotoxic effect of geraniol.

Table 1 - Genotoxicity profile – Geraniol

Group	Micronuclei (%)	Binucleation (%)	Karyolysis (%)	Karyorrhexis (%)	Macronucleus (%)	Normal (%)
C-	2,35± 0,41	1,63 ± 0,41	2,3 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,05±0,18	93,87± 0,07
C+	4,31 ±0,05	4,46 ± 0,27	0,06 ± 0,04	5,68 ± 0,01	4,51±0,26	80,40± 0,10
Geraniol						
(µg / mL)						
1000	3,90±0,05	4,00±1,31	1,72±0,09*	3,00±0,04	4,80±0,55	82,6±0,21*
500	0,10 ±0,08*	0,27±1,19*	1,88±0,06*	0,17±0,06*	0,21±0,12*	97,3±0,29*
100	0,07 ±0,17*	0,20±0,93*	1,40±0,33*	0,14±0,16*	0,30±0,08*	98,6±0,43*
50	0,08±0,23*	1,73±0,08*	0,77±0,12*	0,15±0,49*	0,25±0,33*	99,1±0,21*

* p < 0.05 versus positive control

In this study, geraniol demonstrated a low genotoxic effect at all tested concentrations (50 to 1000 µg/mL), with the majority of cells remaining in a normal state (>85%). Although some cellular alterations, such as the formation of micronuclei, macronuclei, and binucleation, were observed at the 1000 µg/mL concentration, these were less pronounced compared to the positive control, suggesting limited genotoxic activity.

These findings are consistent with the results of Queiroz [22], who evaluated the cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and the human hepatoma cell line (HepG2). The study concluded that although geraniol significantly reduced cell viability at higher concentrations, it did not induce genotoxic or clastogenic/aneugenic effects under the experimental conditions used. Similarly, our study observed a low rate of cellular alterations, particularly at lower concentrations, indicating that geraniol may be a safe option with a lower risk of inducing genetic damage.

Furthermore, Gateva [2] reported that bioactive compounds with antioxidant properties, such as geraniol, may offer protection against DNA damage, potentially explaining the high percentage of normal cells observed in our study. This protective effect is particularly relevant at low geraniol concentrations, where the rate of normal cells approached that of the negative control, suggesting that geraniol may mitigate genotoxic damage induced by exogenous agents.

On the other hand, Singulani [23] explored the cytotoxic effects of different natural compounds and observed that the cytotoxicity of geraniol is dose-dependent, with more pronounced adverse effects at higher concentrations. In our study, the increase in cellular alterations at the 1000 µg/mL concentration supports this observation, suggesting that despite the overall low genotoxic effect, the use of geraniol at high concentrations should be approached with caution due to the potential increase in cytotoxicity.

In summary, our results, along with the studies by Queiroz [22], Gateva [2], and Singulani [23], indicate that geraniol, according to the methodology employed in this study, has a relatively high safety profile at moderate concentrations. However, its application at high doses requires careful consideration of potential cytotoxic effects. Additional studies are needed to more precisely delineate the

underlying mechanisms of the observed effects and to determine the maximum safe dose of geraniol, particularly in therapeutic applications.

The connection between hemolysis and genotoxicity data can be understood through the role of oxidative stress. The increase in ROS not only damages the erythrocyte membrane, leading to hemolysis, but can also interact with DNA, causing genetic damage that may result in genotoxicity. However, the higher proportion of normal cells observed in the genotoxicity assay suggests that geraniol, although capable of inducing damage at high concentrations, has a limited genotoxic potential [20,21,22,23].

Future investigations should focus on elucidating the molecular mechanisms linking oxidative stress to geraniol-induced hemolysis and genotoxicity. Additionally, further studies are necessary to determine the relevance of these findings in clinical contexts, particularly concerning the safety of geraniol in therapies involving prolonged or systemic exposure.

Conclusion

The results of this study demonstrated that geraniol, although it exhibits cytotoxic effects on human erythrocytes, has a relatively high safety profile at moderate concentrations. It was observed that at concentrations of 50 to 100 µg/mL, geraniol did not exert significant toxicity, maintaining hemolytic potential at low levels. However, at higher concentrations (500 to 1000 µg/mL), geraniol induced significant hemolysis, exceeding 80%, suggesting that its use at high doses requires caution.

Furthermore, the evaluation of the genotoxic effects of geraniol on oral mucosal epithelial cells revealed a low rate of cellular alterations, even at the highest concentrations tested.

Data Availability

All data generated or analyzed during this study are included in this published article.

Conflicts of Interest

The authors declare that they have no conflicts of interest.

Supplementary Materials

Figure 1: Cytotoxic effect of geraniol against erythrocytes. Table 1 - Genotoxicity profile – Geraniol. Supplementary Materials.

Authors' Contributions

JKOJ; designed, formatted, and analyzed the data; methods developed; and drafted the first manuscript. FMK, MAAM, NRO, MSA, and AAOFH performed study checks. CLD, LEGB and EOL were responsible for manuscript corrections

REFERÊNCIAS

- [1] Lei Y, Fu P, Jun X, Cheng P. Pharmacological properties of geraniol—a review. *Planta Med.* 2019;85(1):48-55. doi: 10.1055/a-0758-6135.
- [2] Gateva S, Jovtchev A, Stankov A, Georgieva A, Dobрева M, Mileva. The potential of geraniol to reduce cytotoxic and genotoxic effects of MNNG in plant and human lymphocyte test-systems. *South African Journal of Botany.* 2019; 123, 170–179. doi:[10.1016/j.sajb.2019.03.005](https://doi.org/10.1016/j.sajb.2019.03.005).
- [3] Cobanoglu H, Belivermiş M, Sıkdokur E, Kılıç Ö, Çayır A. Genotoxic and cytotoxic effects of polyethylene microplastics on human peripheral blood lymphocytes. *Chemosphere.* 2021; 272, 1-6. doi:[10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129805](https://doi.org/10.1016/J.CHEMOSPHERE.2021.129805).
- [4] Hosseini SM, Hejazian LB, Amani R, Badeli NS. Geraniol attenuates oxidative stress, bioaccumulation, serological and histopathological changes during aluminum chloride-hepatopancreatic toxicity in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res.* 2020;27:19104-19115. doi:10.1007/s11356-020-08128-1.
- [5] Kleinsasser N, Schmid K, Sassen A, Harréus U, Staudenmaier R, Folwaczny M, Glas J, Reichl F. Cytotoxic and genotoxic effects of resin monomers in human salivary gland tissue and lymphocytes as assessed by the single cell microgel electrophoresis (Comet) assay. *Biomaterials.* 2006;27(9):1762-1770. doi:10.1016/j.biomaterials.2005.09.023.

- [6] Hong M, Xu A, Zhou H, Wu L, Randers-Pehrson G, Santella R, Yu Z, Hei T. Mechanism of genotoxicity induced by targeted cytoplasmic irradiation. *Br J Cancer*. 2010;103(9):1263-1268. doi:10.1038/sj.bjc.6605888.
- [7] Rangel M, Malpezzi EL, Susini SM, de Freitas J. Hemolytic activity in extracts of the diatom *Nitzschia*. *Toxicon*. 1997;35(2):305-309. doi:10.1016/s0041-0101(96)00148-1.
- [8] Kassie F, Darroudi F, Kundi M, Schulte-Hermann R, Knasmüller S. Khat (*Catha edulis*) consumption causes genotoxic effects in humans. *Int J Cancer*. 2001;92(3):329-332. doi:10.1002/ijc.1195.
- [9] Cerqueira EM, Gomes-Filho IS, Trindade S, Lopes MA, Passos JS, Machado-Santelli GM. Genetic damage in exfoliated cells from oral mucosa of individuals exposed to X-rays during panoramic dental radiographies. *Mutat Res*. 2004;562(1-2):111-117. doi:10.1016/j.mrgentox.2004.05.008.
- [10] Thomas P, Harvey S, Gruner TM, Fenech M. The buccal cytome and micronucleus frequency is substantially altered in Down's syndrome and normal ageing compared to young healthy controls. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*. 2008;638(1-2):37-47. doi:10.1016/j.mrfmmm.2007.08.012.
- [11] Gabriel HE, Crott J, Ghandour H, Choi SW, Dallal G, Keyes M, et al. Chronic cigarette smoking is associated with diminished folate status, altered folate form distribution, and increased genetic damage in the buccal mucosa of healthy adults. *Am J Clin Nutr*. 2006;83(4):835-841. doi:10.1093/ajcn/83.4.835.
- [12] Carrard VC, Ferreira LA, Lauxen IDS, Costa CH, Rados PV. Teste dos micronúcleos: Um biomarcador de dano genotóxico em células descamadas da mucosa bucal. *Rev Fac Odontol Porto Alegre*. 2007;48(1/3):77-81.
- [13] Sponchiado G, Adam ML, Silva CD, Soley BS, de Mello-Sampayo C, Cabrini DA, et al. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: A

systematic review. J Ethnopharmacol. 2016; 178:289-296. doi:10.1016/j.jep.2015.10.026.

[14] An F, Cao X, Qu H, Wang S. Attenuation of oxidative stress of erythrocytes by the plant-derived flavonoids vitexin and apigenin. Pharmazie. 2015;70(11):724-732.

[15] Hacke ACM, D'Avila da Silva F, Lima D, Rebuglio Velloso JC, Teixeira Rocha JB, Marques JA, Pereira RP. Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. J Ethnopharmacol. 2022; 291:115147. doi:10.1016/j.jep.2022.115147.

[16] Mamur S. Geraniol, a natural monoterpene, identifications of cytotoxic and genotoxic effects in vitro. J Essent Oil Res. 2022;34(1):54-64. doi:10.1080/10412905.2021.1974581.

[17] Hosseini SM, Hejazian LB, Amani R, Siahchrehreh Badeli N. Geraniol attenuates oxidative stress, bioaccumulation, serological and histopathological changes during aluminum chloride-hepatopancreatic toxicity in male Wistar rats. Environ Sci Pollut Res Int. 2020;27(16):20076-20089. doi:10.1007/s11356-020-08128-1.

[18] Varanda EA, Pozetti GL, Lourenço MV, Vilegas W, Raddi MS. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells. J Ethnopharmacol. 2002;81(2):257-264. doi:10.1016/s0378-8741(02)00089-2.

[19] Clancy S. DNA damage & repair: mechanisms for maintaining DNA integrity. Nat Educ. 2008;1(1):103.

[20] Jackson SP, Bartek J. The DNA-damage response in human biology and disease. Nature. 2009;461(7267):1071-1078. doi:10.1038/nature08467.

[21] Swift LH, Golsteyn RM. Genotoxic anti-cancer agents and their relationship to DNA damage, mitosis, and checkpoint adaptation in proliferating cancer cells. Int J Mol Sci. 2014;15(3):3403-3431. doi:10.3390/ijms15033403.

[22] Queiroz TB, Santos GF, Ventura SC, Hiruma-Lima CA, Gaivão IOM, Maistro EL. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). *Genet Mol Res.* 2017;16(3). doi:10.4238/gmr16039777.

[23] Singulani JL, Pedroso RS, Ribeiro AB, Nicolella HD, Freitas KS, Damasceno JL, et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiol.* 2018;13:1637-1646. doi:10.2217/fmb-2018-0200.

6. CONSIDERAÇÕES GERAIS

A presente tese abordou a investigação do geraniol como uma potencial alternativa terapêutica no tratamento de infecções fúngicas associadas à estomatite protética, avaliando suas propriedades antifúngicas, citotóxicas, genotóxicas e os mecanismos de ação envolvidos, com o objetivo de estabelecer parâmetros de segurança e eficácia para o seu uso clínico.

No primeiro artigo, foi demonstrado que o geraniol apresenta uma forte atividade antifúngica contra as cepas de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*, com valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) inferiores a 100 µg/mL, caracterizando-o como um composto promissor no combate a infecções fúngicas orais.

Além disso, o estudo revelou que o geraniol atua desestabilizando a parede celular fúngica e interagindo com o ergosterol, um componente crucial da membrana celular dos fungos, sugerindo que a disrupção dessas estruturas é parte fundamental de seu mecanismo de ação. Adicionalmente, a capacidade do geraniol em atuar sinergicamente com antifúngicos licenciados, como o miconazol, amplia suas possibilidades de aplicação terapêutica, permitindo a redução das doses dos antifúngicos tradicionais e, conseqüentemente, minimizando os efeitos colaterais associados ao tratamento.

No segundo artigo, além de confirmar a atividade antifúngica do geraniol, foram avaliados os efeitos citotóxicos e genotóxicos em eritrócitos humanos e células epiteliais da mucosa oral. Os resultados indicaram que, embora o geraniol apresente um perfil de segurança relativamente alto em concentrações moderadas, ele pode induzir hemólise e danos genéticos em concentrações mais elevadas, evidenciando a necessidade de cautela no uso clínico do composto em doses elevadas. Estes resultados estão em consonância com a literatura existente, que aponta para os riscos de citotoxicidade e genotoxicidade de compostos naturais em concentrações elevadas, ressaltando a importância de estabelecer uma janela terapêutica segura para o uso do geraniol (HACKE et al., 2022; MAMUR, 2022).

A integração dos achados dos dois estudos permite sugerir que, apesar de seu potencial terapêutico promissor, o uso clínico do geraniol deve ser

cuidadosamente monitorado, especialmente em termos de dosagem, para evitar possíveis efeitos adversos. Os dados obtidos reforçam a importância de novos estudos que explorem em maior profundidade os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos citotóxicos e genotóxicos do geraniol, bem como a sua interação com outros compostos antifúngicos (HACKE et al., 2022; MAMUR, 2022).

As limitações dos estudos incluem a necessidade de validação dos resultados *in vitro* e *in silico* em modelos *in vivo*, bem como a investigação de possíveis efeitos a longo prazo do uso do geraniol em ambiente clínico. Além disso, a variabilidade dos resultados entre diferentes tipos celulares e metodologias utilizadas sugere que estudos adicionais são necessários para definir com precisão os parâmetros de segurança e eficácia do geraniol.

A contribuição desta tese ao conhecimento científico reside na caracterização detalhada das atividades antifúngica, citotóxica e genotóxica do geraniol, fornecendo informações pertinentes para a formulação de novas terapias antifúngicas baseadas em compostos naturais. Os impactos potenciais incluem a melhoria das práticas clínicas no tratamento de infecções fúngicas orais, especialmente em pacientes com estomatite protética, e a promoção de alternativas terapêuticas mais seguras e eficazes.

Futuros desdobramentos desse estudo podem incluir a exploração de combinações de geraniol com outros antifúngicos naturais ou sintéticos, visando aumentar sua eficácia e segurança. Além disso, novas investigações sobre a aplicação do geraniol em outras áreas da medicina, como no tratamento de infecções sistêmicas ou em pacientes imunocomprometidos, têm o potencial de expandir o conhecimento sobre o composto e promover o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

8. CONCLUSÃO

As investigações realizadas nesta pesquisa contribuem significativamente para o entendimento das atividades antifúngica, citotóxica e mutagênica do geraniol contra *Candida albicans* e *Candida tropicalis* isoladas de pacientes com estomatite protética. Com base em nossos resultados, pode-se concluir que:

- O geraniol possui forte efeito antifúngico,
- Seus mecanismos de atividade antifúngica envolvem a desestabilização da parede celular e a interação com a membrana plasmática, especialmente com o ergosterol,
- O geraniol exibe potencial sinérgico quando combinado com miconazol, mas apresenta indiferença na associação com nistatina, conforme demonstrado pelo Índice de Concentração Inibitória Fracionada (FICI),
- Apresenta atividade citotóxica em eritrócitos humanos, com efeitos hemolíticos mais acentuados em concentrações elevadas,
- Demonstra um baixo potencial genotóxico em células de mucosa oral, com poucas alterações celulares observadas em concentrações mais altas,
- Estudos de docking molecular confirmam que o geraniol interage significativamente com enzimas fúngicas-chave, como a CYP51 e a β -(1,3)-glucanase, sugerindo que essas interações desempenham um papel fundamental em sua atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS

1. Aguayo S, Marshall H, Pratten J, Bradshaw D, Brown JS, Porter SR, et al. Early adhesion of *Candida albicans* onto dental acrylic surfaces. J Dent Res. 2017;96(8):917–23. doi: 10.1177/0022034517706354.
2. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgrad Med J. 2002;78(922):455-459. doi: 10.1136/pmj.78.922.455.
3. Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem Toxicol. 2008;46(2):446-475. doi: 10.1016/j.fct.2007.09.106.
4. Balouiri M, Sadiki M, Ibnsouda SK. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. J Pharm Anal. 2016;6(2):71-79. doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005.
5. Barbosa AH, Damasceno JL, Casemiro LA, Martins CHG, Pires RH, Candido RC. Susceptibility to Oral Antiseptics and Virulence Factors Ex Vivo Associated with *Candida* spp. Isolated from Dental Prostheses. J Prosthodont. 2019 Apr;28(4):398-408. doi: 10.1111/jopr.13037.
6. Bard M, Albrecht MR, Gupta N, Guynn CJ, Stillwell W. Geraniol interferes with membrane functions in strains of *Candida* and *Saccharomyces*. Lipids. 1988;23(6):534-538. doi: 10.1007/BF02535298.
7. Barros DB, Lima LO, Silva LA, Fonseca MC, Ferreira RC, Diniz Neto H, et al. α -Pinene: Docking Study, Cytotoxicity, Mechanism of Action, and Anti-Biofilm Effect against *Candida albicans*. Antibiotics. 2023;12(480):1-11. doi: 10.3390/antibiotics12030480.
8. Bell EW, Zhang Y. DockRMSD: an open-source tool for atom mapping and RMSD calculation of symmetric molecules through graph isomorphism. J Cheminform. 2019;11:40. doi: 10.1186/s13321-019-0362-7.

9. Bohner F, Pudleiner R, Lerch T, Tost M, Schneider S, Jorde S, et al. The effect of antifungal resistance development on the virulence of *Candida* species. *FEMS Yeast Res.* 2022;22(1):1-10. doi: 10.1093/femsyr/foab067.
10. Brasil. Ministério da Saúde. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2020 [Internet]. Available from: <http://portalms.saude.gov.br/assistencia-farmaceutica/medicamentos-renom>. Accessed June 23, 2024
11. Budtz-Jorgensen E, Stenderup A, Grabowski M. An epidemiologic study of yeasts in elderly denture wearers. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1975;3:115-119. doi: 10.1111/j.1600-0528.1975.tb00231.x.
12. Castanheira M, Deshpande LM, Costello AJ, Jones RN. Determinants of antifungal resistance among *Candida* spp. *Clin Infect Dis.* 2017;65(8):1279-1285. doi: 10.1093/cid/cix610.
13. Chen J, Chen F, Liu W, Yu M, Li M, Wang Y. Treatment with geraniol ameliorates methionine-choline-deficient diet-induced non-alcoholic steatohepatitis in rats. *J Gastroenterol Hepatol.* 2016;31(7):1357-1365. doi: 10.1111/jgh.13311.
14. Cheng L, Niu Y, Zhou X, Xu X. Natural products and caries prevention. *Caries Res.* 2015;49(Suppl 1):38-45. doi: 10.1159/000380888
15. Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard. CLSI document M27-A3 and Supplement S. Wayne, PA: CLSI; 2017.
16. Cortés JAL, Russi JNA. Echinocandins. *Rev Chilena Infectol.* 2011;28(6):529-536. doi: 10.4067/S0716-10182011000600009.
17. Cuenca-Estrella M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importancia del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistências. *Rev Esp*

Quimioter. 2010;23(4):169-176.

18. Epinell A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. *Rev Iberoam Micol.* 2008;25(3):101-106. doi: 10.1016/S1130-1406(08)70041-0.

19. Escalante A, Gattuso M, Pérez P, Zacchino S. Evidence for the mechanism of action of the antifungal phytolaccoside B isolated from *Phytolacca tetramera* Hauman. *J Nat Prod.* 2008;71:1720-1725. doi: 10.1021/np800167m.

20. Espinel-Ingroff A, Bartlett M, Bowden R, Chin N, Cooper C, Fothergill A, et al. Multicenter evaluation of a proposed standardized procedure for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. *J Clin Microbiol.* 1997;35:139-143. doi: 10.1128/jcm.35.1.139-143.1997.

21. Fatima T, Fatima Z, Hameed S. Abrogation of efflux pump activity, biofilm formation, and immune escape by candidacidal geraniol in emerging superbug, *Candida auris*. *Int Microbiol.* 2023;26(4):881-891. doi: 10.1007/s10123-023-00272-9.

22. Freire JCP, Júnior JKO, Silva DF, de Sousa JP, Guerra FQS, de Oliveira Lima E. Antifungal Activity of Essential Oils against *Candida albicans* Strains Isolated from Users of Dental Prostheses. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2017;2017:7158756. doi: 10.1155/2017/7158756.

23. Freires IA, Rosalen PL. How natural product research has contributed to oral care product development? A critical view. *Pharm Res.* 2016;33:1311-1317. doi: 10.1007/s11095-016-1880-2.

24. Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. Antibacterial activities of plant essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem.* 2004;52(19):6042–6048. doi: 10.1021/jf049629m.

25. Frost DJ, Brandt KD, Cugier D, Goldman R. A whole-cell *Candida albicans* assay

for the detection of inhibitors towards fungal cell wall synthesis and assembly. *J Antibiot*. 1995;28(4):306-309. doi: 10.1038/ja.1995.121.

26. Gendreau L, Loewy ZG. Epidemiology and etiology of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2011;20(4):251-260. doi: 10.1111/j.1532-849X.2011.00698.x.

27. Gupta A, Venkataraman M. Antifungal resistance in superficial mycoses. *J Dermatol Treat*. 2021;33:1888-1895. doi: 10.1080/09546634.2021.1942421.

28. Hacke ACM, D'Avila da Silva F, Lima D, Rebuglio Velloso JC, Teixeira Rocha JB, Marques JA, Pereira RP. Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. *J Ethnopharmacol*. 2022;291:115147. doi:10.1016/j.jep.2022.115147.

29. Hafidh RR, Abdulamir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshiri F, et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *Open Microbiol J*. 2011;5:96. doi: 10.2174/1874285801105010096.

30. Hannah VE, O'Donnell L, Robertson D, Ramage G. Denture Stomatitis: Causes, Cures and Prevention. *Prim Dent J*. 2017 Dec;6(4):46-51. doi: 10.1308/205016817822230175.

31. Hemaiswarya S, Doble M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram-negative bacteria. *Phytomedicine*. 2009;16(11):997–1005. doi: 10.1016/j.phymed.2009.04.004.

32. Hosseini SM, Hejazian LB, Amani R, Siahchrehreh Badeli N. Geraniol attenuates oxidative stress, bioaccumulation, serological and histopathological changes during aluminum chloride-hepatopancreatic toxicity in male Wistar rats. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2020;27(16):20076-20089. doi:10.1007/s11356-020-08128-1.

33. Houghton PJ, Howes MJ, Lee CC, Steventon G. Uses and abuses of in vitro tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J Ethnopharmacol*. 2007;110:391-400.

doi: 10.1016/j.jep.2007.02.015.

34. Iosif L, Preoteasa CT, Murariu-Magureanu C, Preoteasa E. Clinical study on thermography, as modern investigation method for Candida-associated denture stomatitis. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(1):191-195.

35. Jeon JG, Rosalen PL, Falsetta ML, Koo H. Natural products in caries research: current (limited) knowledge, challenges and future perspective. *Caries Res*. 2011;45(3):243-263. doi: 10.1159/000327250.

36. Kessler L, Warn PA, Hoog S, Verweij PE. Triazoles in antifungal therapy: mechanisms of action and resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. 2022;66(2):e01920-21. doi: 10.1128/aac.01920-21.

37. Khan AQ, Kuttan G, Chandrasekharan K, Soni TG, Shahani SR, Bagchi M, et al. Geraniol attenuates 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced oxidative stress and inflammation in mouse skin: Possible role of p38 MAP Kinase and NF- κ B. *Exp Mol Pathol*. 2013;94(3):419-429. doi: 10.1016/j.yexmp.2013.02.011.

38. Khan MSA, Ahmad I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2012;67(3):618-621. doi: 10.1093/jac/dkr517.

39. Khan SMA, Malik A, Ahmad I. Anti-candidal activity of essential oils alone and in combination with amphotericin B or fluconazole against multi-drug resistant isolates of *Candida albicans*. *Med Mycol*. 2012;50(1):33–42. doi: 10.3109/13693786.2011.579609.

40. Kurnaz ML, Kurnaz IA. Commercialization of medicinal bioeconomy resources and sustainability. *Sustain Chem Pharm*. 2021;22:100484. doi: 10.1016/j.scp.2021.100484.

41. Le Bars P, Kouadio AA, Bandiaky ON, Le Guéhennec L, de La Cochetière MF. Host's Immunity and *Candida* Species Associated with Denture Stomatitis: A Narrative Review. *Microorganisms*. 2022 Jul;10(7):1437. doi: 10.3390/microorganisms10071437.

42. Lei Y, Fu P, Jun X, Cheng P. Pharmacological properties of geraniol—a review. *Planta Med.* 2019;85(1):48-55. doi: 10.1055/a-0758-6135.
43. Leite DP, Piva MR, Martins-Filho PR. Identificação das espécies de *Candida* em portadores de estomatite protética e avaliação da susceptibilidade ao miconazol e a terapia fotodinâmica. *Rev Odontol UNESP.* 2015;44(1):12-17. doi: 10.1590/1807-2577.0441.
44. Leite MC, de Brito Bezerra AP, de Sousa JP, de Oliveira Lima E. Investigating the antifungal activity and mechanism(s) of geraniol against *Candida albicans* strains. *Med Mycol.* 2015 Apr;53(3):275-84. doi: 10.1093/mmy/myu078.
45. Lyu X, Zhao C, Yan ZM, Hua H. Efficacy of nystatin for the treatment of oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Drug Des Devel Ther.* 2016;10:1161-1171. doi: 10.2147/DDDT.S100795.
46. Mady OY, Donia AM, Al-Madboly LA. Miconazole-urea in a buccal film as a new trend for treatment of resistant mouth fungal white patches. *Front Microbiol.* 2018;9:360223. doi: 10.3389/fmicb.2018.00360.
47. Mamur S. Geraniol, a natural monoterpene, identifications of cytotoxic and genotoxic effects in vitro. *J Essent Oil Res.* 2022;34(1):54-64. doi:10.1080/10412905.2021.1974581.
48. Marcos-Arias C, Eraso E, Madariaga L, Quindós G. In vitro activities of natural products against oral *Candida* isolates from denture wearers. *BMC Complement Altern Med.* 2011;11:119. doi: 10.1186/1472-6882-11-119.
49. Menezes EA, Araújo RP, Guedes GM, Cunha JC, Oliveira EL, Dias WQ, et al. Perfil de suscetibilidade de *Candida tropicalis* a antifúngicos sistêmicos. *Rev Patol Trop.* 2013;42(1):49-55. doi: 10.5216/rpt.v42i1.18614.
50. Miron D, Battisti F, Silva FK, Lana AD, Pippi B, Casanova B, et al. Antifungal activity

and mechanism of action of monoterpenes against dermatophytes and yeasts. *Rev Bras Farmacogn.* 2014;24:660-667. doi: 10.1016/j.bjp.2014.11.009.

51. Mishra R, Panda AK, De Mandal S, Shakeel M, Bisht SS, Khan J. Natural anti-biofilm agents: strategies to control biofilm-forming pathogens. *Front Microbiol.* 2020;11:566325. doi: 10.3389/fmicb.2020.566325.

52. Mumcu G, Cimilli H, Sur H, Gunes M, Ozaydin M, Hayran O. Prevalence and distribution of oral lesions: a cross-sectional study in Turkey. *Oral Dis.* 2005;11:81-87. doi: 10.1111/j.1601-0825.2004.01056.x.

53. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *Afr J Biotechnol.* 2008;7(12):1797-1806. doi: 10.4314/ajb.v7i12.59067.

54. Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *J Nat Prod.* 2016;79(3):629-661. doi: 10.1021/acs.jnatprod.5b01055.

55. Newton AV. Estudo clínico, microbiológico e histopatológico da estomatite por dentadura. *Rev Bras Patol Oral.* 2003;2(1):3-1

56. Patil S, Rao RS, Majumdar B, Anil S. Clinical appearance of oral Candida infection and therapeutic strategies. *Front Microbiol.* 2015;6:1391. doi: 10.3389/fmicb.2015.01391.

57. Pereira JM, Paiva JA. Tratamento da Candidíase Invasiva no Doente Crítico. *Rev Port Med Intensiva.* 2010;7(1):23-30.

58. Perić M, Andjelković U, Marković D, Mihailović D. A Systematic Review of Denture Stomatitis: Predisposing Factors, Clinical Features, Etiology, and Global Candida spp. Distribution. *J Fungi.* 2024;10(5):328. doi: 10.3390/jof10050328.

59. Pigatto MC, Uchoa FT, Costa TD. Farmacocinética dos novos antifúngicos de uso

sistêmico utilizados em pacientes imunocomprometidos. *Rev Bras Farmacol.* 2009;90(1):86-94.

60. Pinteá AM, Gherman R, Timofte CD. Optimization of a miconazole oral gel formulation for the treatment of fungal infections. *J Pharm Sci.* 2022;111(1):128-135. doi: 10.1016/j.xphs.2021.08.019.

61. Qi F, Liu Z, Wu Z, Li J, Zhao L, Li H, et al. Geraniol and geranyl acetate induce potent anticancer effects in colon cancer Colo-205 cells by inducing apoptosis, DNA damage and cell cycle arrest. *J BUON.* 2018;23(2):346-352.

62. Queiroz TB, Santos GF, Ventura SC, Hiruma-Lima CA, Gaivão IOM, Maistro EL. Cytotoxic and genotoxic potential of geraniol in peripheral blood mononuclear cells and human hepatoma cell line (HepG2). *Genet Mol Res.* 2017;16(3):1-12. doi: 10.4238/gmr16039734.

63. Quindós G, Marcos-Arias C, San-Millán R, Mateo E, Eraso E. Therapeutic tools for oral candidiasis: current and new antifungal drugs. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2019;24(2):e172-e180. doi: 10.4317/medoral.22812.

64. Rai A, Hiray A, Gedam S, Bagwan S, Gosavi S. Nystatin effectiveness in oral candidiasis treatment: a systematic review and meta-analysis of clinical trials. *Life.* 2022;12(11):1677. doi: 10.3390/life12111677.

65. Salerno C, Pascale M, Contaldo M, Esposito V, Busciolano M, Guida A, et al. Candida-associated denture stomatitis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(2):e139-143. doi: 10.4317/medoral.16.e139.

66. Sanita PV, Machado AL, Pavarina AC, Massucato EMS, Colombo AL, Vergani CE. Microwave denture disinfection versus nystatin in treating patients with well-controlled type 2 diabetes and denture stomatitis: A randomized clinical trial. *Int J Prosthodont.* 2012;25:232-244. doi: 10.11607/ijp.2788.

67. Sharma Y, Khan L, Manzoor N, Manzoor N. Anti-Candida activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *J Mycol Med.* 2016;26(3):244-254. doi: 10.1016/j.mycmed.2016.04.004.
68. Shui Y, Li J, Lyu X, Wang Y. Phytotherapy in the management of denture stomatitis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Phytother Res.* 2021;35(8):4111-4126. doi: 10.1002/ptr.7073.
69. Shulman JD, Rivera-Hidalgo F, Beach MM. Risk factors associated with denture stomatitis in the United States. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(6):340-346. doi: 10.1111/j.1600-0714.2005.00325.x.
70. Silva LM, Goulart LS, Santos AP, Almeida M, Brighenti FL. Nanoparticles and nanomaterials in dentistry. *J Appl Oral Sci.* 2020;28:e20200091. doi: 10.1590/1678-7757-2020-0091.
71. Silva MM, Mima EGD, Colombo AL, Sanita PV, Jorge JH, Massucato EMS, et al. Comparison of denture microwave disinfection and conventional antifungal therapy in the treatment of denture stomatitis: A randomized clinical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;114(4):469-477. doi: 10.1016/j.oooo.2012.02.016.
72. Singh S, Fatima Z, Hameed S. Insights into the mode of action of anticandidal herbal monoterpenoid geraniol reveal disruption of multiple MDR mechanisms and virulence attributes in *Candida albicans*. *Arch Microbiol.* 2016;198(5):459-472. doi: 10.1007/s00203-016-1200-x.
73. Singulani JL, Pedroso RS, Ribeiro AB, Nicolella HD, Freitas KS, Damasceno JL, et al. Geraniol and linalool anticandidal activity, genotoxic potential and embryotoxic effect on zebrafish. *Future Microbiol.* 2018;13(15):1637-1646. doi: 10.2217/fmb-2018-0175.
74. Vallejo MJ, Diaz-Canel AI, Martin JM, Garcia-Riesco M. Risk factors for oral soft tissue lesions in an adult Spanish population. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002;30:277-285. doi: 10.1034/j.1600-0528.2002.00044.x.

75. Vandenbosch D, Braeckmans K, Nelis H, Coenye T. Fungicidal activity of miconazole against *Candida* spp. biofilms. *J Antimicrob Chemother*. 2010;65(4):694-700. doi: 10.1093/jac/dkq019.
76. Webb B, Thomas C, Whittle T. A 2-year study of *Candida*-associated denture stomatitis treatment in aged care subjects. *Gerodontology*. 2005;22(3):168-76. doi: 10.1111/J.1741-2358.2005.00065.X.
77. Yarborough A, Cooper L, Duqum I, Mendonça G, McGraw K, Stoner L, et al. Evidence regarding the treatment of denture stomatitis. *J Prosthodont*. 2016;25(4):288-301. doi: 10.1111/jopr.12414.
78. Zhang LW, Fu JY, Hua H, Yan ZM. Efficacy and safety of miconazole for oral candidiasis: a systematic review and meta-analysis. *Oral Dis*. 2016;22(3):185-195. doi: 10.1111/odi.12409.
79. Zomorodian K, Kavosi G, Pishva E, Bandegani A, Sedaghat F, Shams-Ghahfarokhi M, et al. Assessment of *Candida* species colonization and denture-related stomatitis in complete denture wearers. *Med Mycol*. 2011;49(2):208-211. doi: 10.3109/13693786.2010.527956.
80. Zore GB, Thakre AD, Jadhav S, Karuppayil SM. Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine*. 2011;18(13):1181–1190. doi: 10.1016/j.phymed.2011.03.008.

ANEXO A: COMPROVANTE DE SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

Geraniol and Its Effects on Human Cells: A Study of Cytotoxicity and Genotoxicity

Dear Professor José Klidenberg de Oliveira Júnior,

Congratulations, the manuscript titled "Geraniol and Its Effects on Human Cells: A Study of Cytotoxicity and Genotoxicity" has been successfully submitted to The Scientific World Journal.

We will confirm this submission with all authors of the manuscript, but you will be the primary recipient of communications from the journal. As submitting author, you will be responsible for responding to editorial queries and making updates to the manuscript.

In order to view the status of the manuscript, please visit the manuscript details page.

Thank you for submitting your work to The Scientific World Journal.

[MANUSCRIPT DETAILS](#)

Kind regards,
Polen Ilagan
The Scientific World Journal

ANEXO B: CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CERTIDÃO

Certifico que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba – CEP/CCS aprovou por unanimidade na 6ª Reunião realizada no dia 21/07/2016, o Projeto de pesquisa intitulado: **“SAÚDEARTE: TROCA DE SABERES E DIFUSÃO DA CIDADANIA”**, da pesquisadora Edeltrudes de Oliveira Lima. Prot. nº 0395/16. CAAE: 57435016.4.0000.5188.

Outrossim, informo que a autorização para posterior publicação fica condicionada à apresentação do resumo do estudo proposto à apreciação do Comitê.


Andressa Mitrícia do C. Lima
Mat. SIAPE 1117510
Secretária do CEP-CCS-UFPB

**ANEXO C: CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA OS ENSAIOS DE
CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE**

CERTIDÃO DO COMITÊ DE ÉTICA PARA OS ENSAIOS DE CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE



COMITÊ
DE ÉTICA
EM PESQUISA

CENTRO UNIVERSITÁRIO DE
PATOS - UNIFIP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E DETERMINAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICOS DE PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS

Pesquisador: MILLENA DE SOUZA ALVES

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 68900423.7.0000.5181

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 6.076.256

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma pesquisa experimental que será realizada nos Laboratórios de bioquímica da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UFCG/CSTR) em parceria com o Liga Acadêmica de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia (LAFBIM), coordenado pelo Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho. A pesquisa contará com a doação de amostras de sangue de jovens adultos doadores saudáveis tipo (A, B e O), além de esfregaço de mucosa oral para obtenção de pellet de células eucarióticas. A população amostral será constituída de alunos da Universidade Federal de Campina Grande (campus Patos - PB) dos cursos de Ciências Biológicas e Odontologia, participantes ativos da Liga Acadêmica de Fitoterapia, Bioquímica e Microbiologia coordenada pelo Professor Dr. Abrahão Alves De Oliveira Filho. Os participantes serão escolhidos através dos critérios de inclusão e exclusão. Doadores maiores que 18 anos, saudáveis, ambos os sexos. Como exclusão: participantes com idade superior a 40 anos, com queixas de anemia ou mucosite oral, ou os que não aceitarem ou desistirem de fazer parte da pesquisa.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Avaliar o potencial antimicrobiano e a toxicidade in vitro e ex vivo de substâncias naturais e sintéticas bioativas.

Objetivo Secundário:

Endereço: Rua Horácio Nóbrega S/N - Bloco "G" - 2º Andar

Bairro: Belo Horizonte

CEP: 58.704-000

UF: PB

Município: PATOS

Telefone: (83)3421-7300

Fax: (83)3421-4047

E-mail: cep@fiponline.edu.br